

PATENTE

Número de expediente del apoderado: P-343-PCT

Número de cliente: 27038

**AMIDAS HETEROCÍCLICAS DE 5 A 7 MIEMBROS COMO
INHIBIDORES DE JAK**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La invención se dirige a compuestos útiles como cinasa inhibidores de cinasa JAK. La invención también se dirige a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y a métodos de uso de dichos compuestos para tratar enfermedades respiratorias.

Estado actual de la técnica

El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias para la que no existen prevenciones ni curas. La enfermedad se caracteriza por inflamación, fibrosis, hiperreactividad y remodelación de las vías respiratorias, todo lo cual contribuye a la limitación del flujo de aire. Se estima que 300 millones de personas en todo el mundo padecen asma y que el número de asmáticos aumentará en más de 100 millones para el año 2025. En los Estados Unidos, el asma afecta aproximadamente del 6% al 8% de la población, lo que la convierte en una de las enfermedades crónicas más comunes del país. Aunque la mayoría de los pacientes pueden controlar los síntomas del asma mediante el uso de corticoides inhalados que pueden combinarse con un modificador de leucotrienos y/o un agonista beta de acción prolongada, queda un subconjunto de pacientes con asma grave cuya enfermedad no se controla con terapias convencionales. El asma grave persistente se define como una enfermedad que no se controla con altas dosis de corticoides inhalados. Si bien se estima que los asmáticos graves representan aproximadamente el 5% de todos los pacientes de asma, tienen un alto riesgo de morbilidad y mortalidad y son responsables de un porcentaje

desproporcionado de utilización de recursos de atención médica entre los asmáticos. Sigue existiendo la necesidad de nuevas terapias para tratar a estos pacientes.

Las citocinas son moléculas de señalización intercelular que incluyen quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y factor de necrosis tumoral. Las citocinas son fundamentales para el crecimiento celular normal y la inmunorregulación, pero también impulsan las enfermedades inmunomediadas y contribuyen al crecimiento de células malignas. Las concentraciones elevadas de varias citocinas se han relacionado con la patología de inflamación por asma. Por ejemplo, se ha demostrado que las terapias con base en anticuerpos dirigidas a las interleucinas (IL)-5 y 13 proporcionan un beneficio clínico en subconjuntos de pacientes con asma grave. Entre las citocinas implicadas en la inflamación por asma, muchas actúan a través de vías de señalización dependientes de la familia de tirosina kinasas (JAK), que envían señales a través de la familia de transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) de factores de transcripción. Las citocinas implicadas en la inflamación por asma que envían señales a través de la vía de JAK-STAT incluyen IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), interferón- γ (IFN γ) y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF).

La familia de JAK comprende cuatro miembros, JAK1, JAK2, JAK3 y tirosina kinasa 2 (TYK2). La unión de la citocina a un receptor de citocina dependiente de JAK induce la dimerización del receptor, lo que da como resultado la fosforilación de residuos de tirosina en la kinasa JAK, lo que efectúa la activación de JAK. Las JAK fosforiladas, a su vez, unen y fosforilan varias proteínas STAT que se dimerizan, internalizan en el núcleo celular y modulan directamente la transcripción génica, lo que conduce, entre otros, a los efectos posteriores asociados con la enfermedad inflamatoria. Las JAK suelen asociarse con receptores de citocinas en pares como homodímeros o

heterodímeros. Las citocinas específicas se asocian con emparejamientos específicos de JAK. Cada uno de los cuatro miembros de la familia de JAK está implicado en la señalización de al menos una de las citocinas asociadas con la inflamación por asma. En consecuencia, un inhibidor químico con panactividad contra todos los miembros de la familia de JAK podría modular una amplia gama de vías proinflamatorias que contribuyen al asma grave.

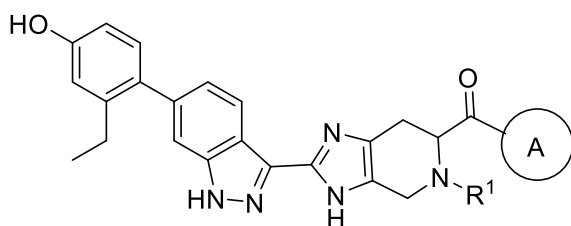
Sin embargo, el amplio efecto antiinflamatorio de dichos inhibidores podría suprimir la función normal de las células inmunitarias, lo que podría conducir a un mayor riesgo de infección. Se han observado indicios de un mayor riesgo de infección con el inhibidor de JAK tofacitinib, que se dosifica por vía oral para el tratamiento de la artritis reumatoide. En el asma, la inflamación se localiza en las vías respiratorias. La inflamación de las vías respiratorias es característica de otras enfermedades respiratorias además del asma. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis quística (CF), la neumonitis, las enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática), la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la bronquitis, el enfisema y la sarcoidosis también son enfermedades de las vías respiratorias en las que se cree que la fisiopatología está relacionada con las citocinas de señalización de JAK. La administración local de un inhibidor de JAK a los pulmones por inhalación ofrece el potencial de ser terapéuticamente eficaz al administrar un agente anticitocina potente directamente al sitio de acción, lo que limita la exposición sistémica y por lo tanto limita el potencial de inmunosupresión sistémica adversa. Aún existe la necesidad de un inhibidor potente de JAK adecuado para la administración local a los pulmones para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Las citocinas de señalización de JAK también desempeñan un papel importante en la activación de células T, un subtipo de células inmunitarias que es esencial para muchos procesos inmunitarios. La activación patológica de células T es fundamental en la etiología de varias enfermedades respiratorias.

Las células T autorreactivas participan en la bronquiolitis obliterante mediante la organización de la neumonía (también denominada COS). Al igual que la COS, la etiología de los rechazos de trasplantes de pulmón está vinculada a una activación aberrante de células T de las células T del receptor según el pulmón del donante trasplantado. Los rechazos de trasplantes de pulmón pueden ocurrir temprano como disfunción primaria del injerto (PGD), neumonía organizada (OP), rechazo agudo (AR) o bronquiolitis linfocítica (LB) o pueden ocurrir años después del trasplante como disfunción crónica del aloinjerto pulmonar (CLAD). La CLAD se conocía anteriormente como bronquiolitis obliterante (BO), pero ahora se considera un síndrome que puede tener diferentes manifestaciones patológicas, incluidas BO, CLAD restrictiva (rCLAD o RAS) y disfunción neutrofílica del aloinjerto. La disfunción crónica del aloinjerto pulmonar (CLAD) es un desafío importante en el manejo terapéutico a largo plazo de receptores de trasplantes de pulmón, ya que provoca que un pulmón trasplantado pierda funcionalidad de forma progresiva (Gauthier *et al.*, *Curr. Transplant. Rep.*, **2016**, 3(3), 185–191). La CLAD responde al tratamiento de forma deficiente y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de compuestos eficaces capaces de prevenir o tratar esta afección. Varias citocinas dependientes de JAK, tales como IFN γ e IL-5, están reguladas al alza en la CLAD y el rechazo de trasplante de pulmón (Berastegui *et al.*, *Clin. Transplant.* **2017**, 31, e12898). Además, las altas concentraciones pulmonares de quimiocinas CXCR3, tales como CXCL9 y CXCL10, que se encuentran secuenciadas abajo de la señalización de IFN dependiente de JAK, están vinculadas a peores resultados en pacientes con trasplante de pulmón (Shino *et al.*, *PLOS One*, **2017**, 12 (7), e0180281). Se ha demostrado que la inhibición sistémica de JAK es eficaz en el rechazo de trasplantes de riñón (Vicenti *et al.*, *American Journal of Transplantation*, **2012**, 12, 2446-56). Por lo tanto, los inhibidores de JAK tienen el potencial de ser eficaces para tratar o prevenir el rechazo de trasplante de pulmón y CLAD. Los eventos de activación de células

En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos que actúan como inhibidores de cinasa JAK.

(I):



donde:

A es un anillo heterociclilo monocíclico de 6 a 7 miembros que contiene dos átomos de nitrógeno, donde A está conectado al grupo carbonilo en (I) a través de un átomo de nitrógeno, A se sustituye con 1 a 3 grupos R^2 y

opcionalmente dos grupos R^2 forman un anillo enlazado por puentes $-(CH_2)-$ con A; o

A es pirrolidinilo, donde el pirrolidinilo se conecta al grupo carbonilo en (I) a través de un átomo de nitrógeno y donde el pirrolidinilo se sustituye con NR^3R^4 ;

R^1 es alquilo C_{1-3} ;

cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$;

R^3 es alquilo C_{1-3} ;

y R^4 es alquilo C_{1-3} ;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

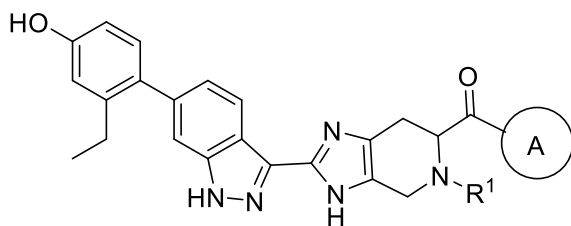
La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un método para tratar enfermedades respiratorias, en particular, asma o CLAD, en mamíferos, método que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o de una composición farmacéutica de la invención.

La invención también proporciona un compuesto de la invención como se describe en el presente documento para su uso en la terapia médica, así como el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de una formulación o medicamento para tratar una enfermedad respiratoria en un mamífero.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización, la invención proporciona nuevos compuestos que actúan como inhibidores de cinasa JAK. En consecuencia, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I):



(I)

donde:

A es un anillo heterociclilo monocíclico de 6 a 7 miembros que contiene dos átomos de nitrógeno, donde A está conectado al grupo carbonilo en (I) a través de un átomo de nitrógeno, A se sustituye con 1 a 3 grupos R^2 y opcionalmente dos grupos R^2 forman un anillo enlazado por puentes $-(CH_2)-$ con A; o

A es pirrolidinilo, donde el pirrolidinilo se conecta al grupo carbonilo en (I) a través de un átomo de nitrógeno y donde el pirrolidinilo se sustituye con NR^3R^4 ;

R^1 es alquilo C_{1-3} ;

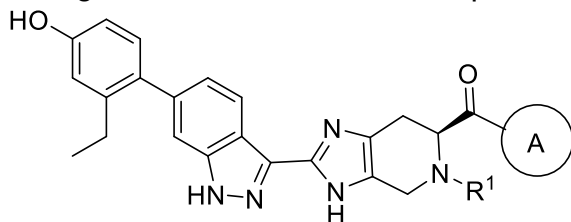
cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$;

R^3 es alquilo C_{1-3} ;

y R^4 es alquilo C_{1-3} ;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas realizaciones, el compuesto (I) tiene la fórmula (I'):

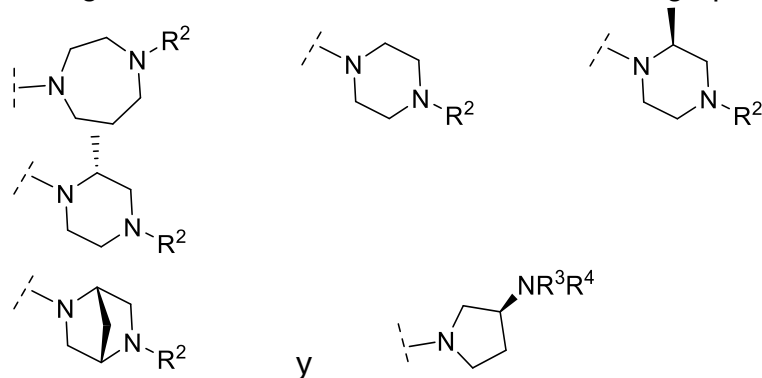


(I')

En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, propilo e isopropilo.

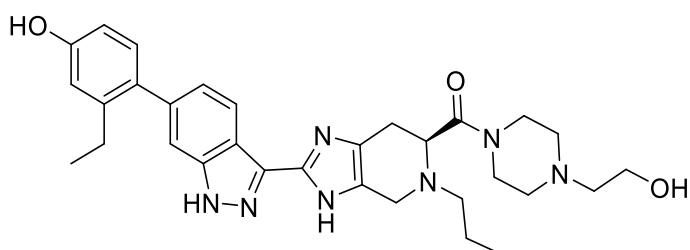
En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consiste en piperazinilo, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptanilo y 1,4-diazacicloheptanilo, cada uno de los cuales se sustituye con 1 o 2 grupos R^2 , donde cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$, o A es pirrolidinilo sustituido con NR^3R^4 , donde R^3 es alquilo C_{1-3} y R^4 es alquilo C_{1-3} .

En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consiste en:



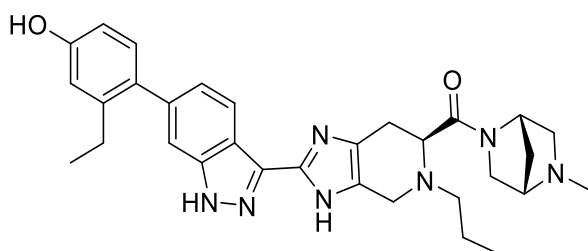
donde R^2 es alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$, R^3 es alquilo C_{1-3} y R^4 es alquilo C_{1-3} .

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



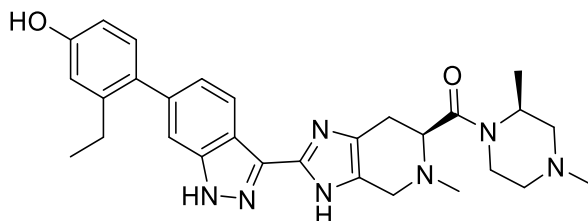
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



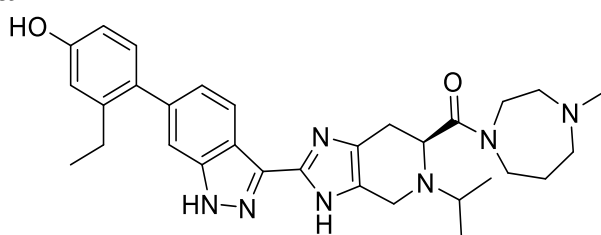
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



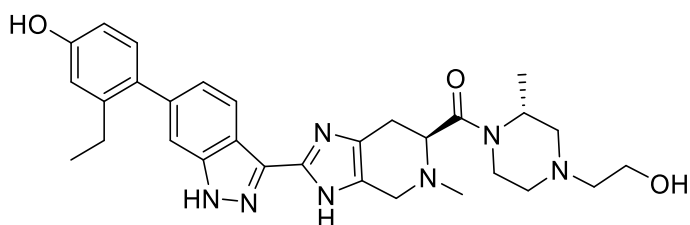
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



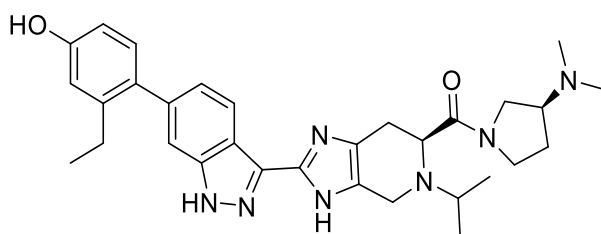
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



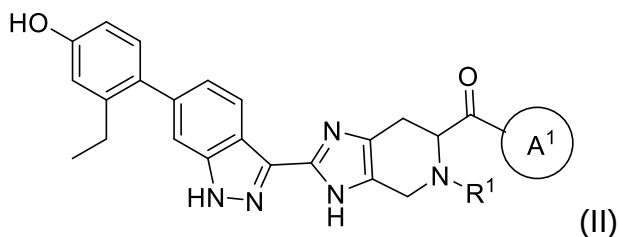
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

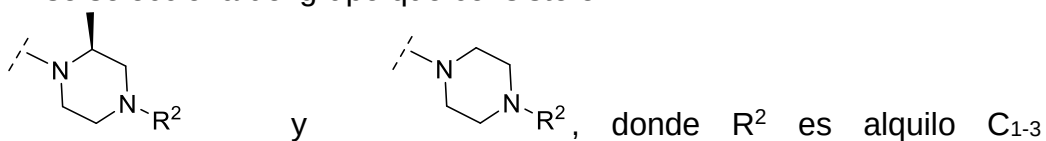
En otra realización, la divulgación proporciona un compuesto de la fórmula (II):



donde:

R^1 es alquilo C_{1-3} ;

A^1 se selecciona del grupo que consiste en:

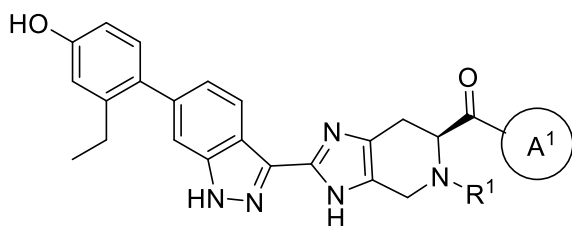


opcionalmente sustituido con $-OH$;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula (II) tiene la fórmula

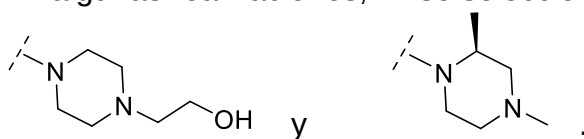
(II'):



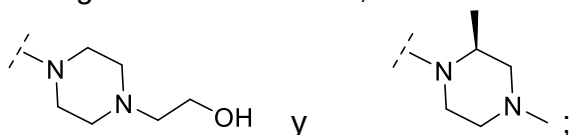
(II')

En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo y propilo.

En algunas realizaciones, A^1 se selecciona del grupo que consiste en:

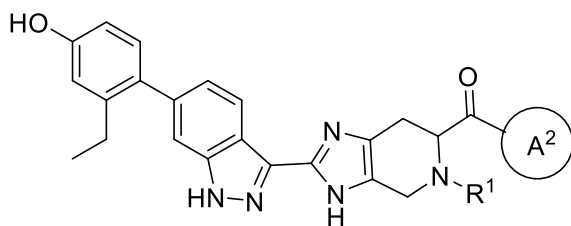


En algunas realizaciones, A^1 se selecciona del grupo que consiste en:



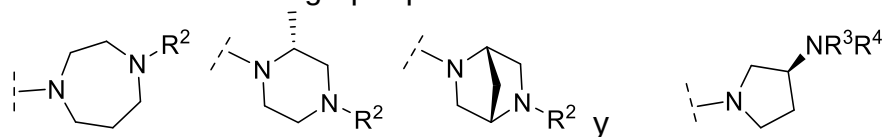
y R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo y propilo.

En otra realización, la divulgación proporciona un compuesto de la fórmula (III):



(III)

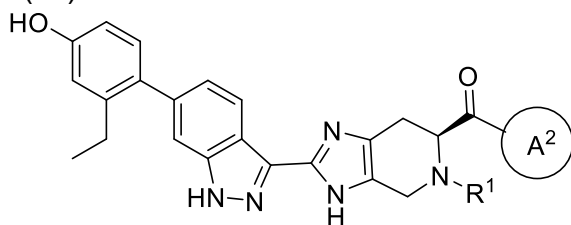
donde:

 R^1 es alquilo C_{1-3} ; A^2 se selecciona del grupo que consiste en:

donde cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$, R^3 es alquilo C_{1-3} y R^4 es alquilo C_{1-3} ;

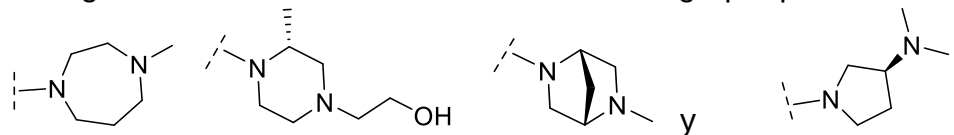
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula (III) tiene la fórmula (III'):

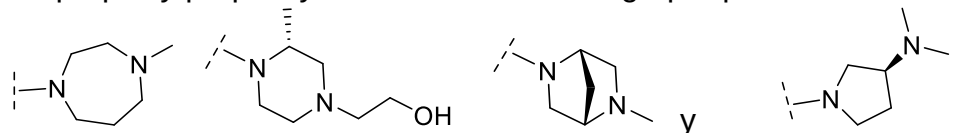


(III')

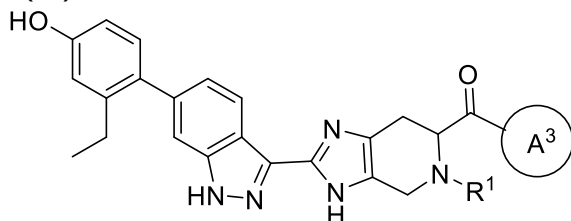
En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, isopropilo y propilo.

En algunas realizaciones, A^2 se selecciona del grupo que consiste en:

En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, isopropilo y propilo, y A^2 se selecciona del grupo que consiste en:



En otra realización, la divulgación proporciona un compuesto de la fórmula (IV):

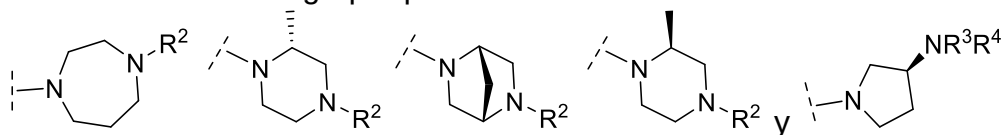


(IV)

donde:

R^1 es alquilo C_{1-3} ;

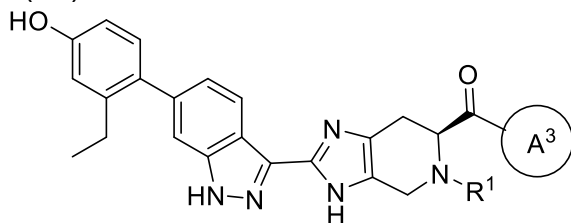
A^3 se selecciona del grupo que consiste en:



donde cada R^2 es independientemente alquilo C_{1-3} opcionalmente sustituido con $-OH$, R^3 es alquilo C_{1-3} y R^4 es alquilo C_{1-3} ;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

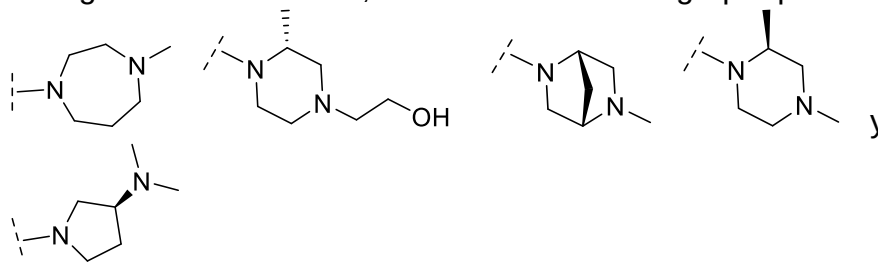
En algunas realizaciones, el compuesto de la fórmula (IV) tiene la fórmula (IV'):



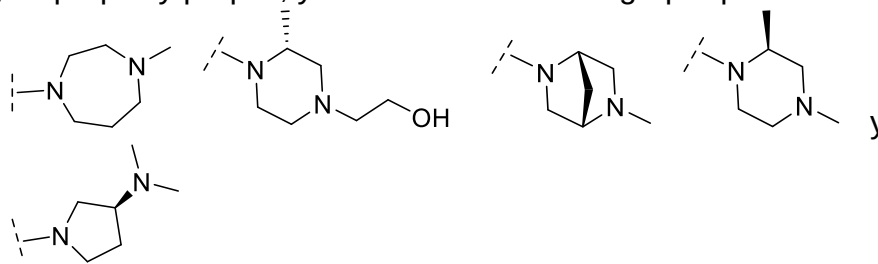
(IV')

En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, isopropilo y propilo.

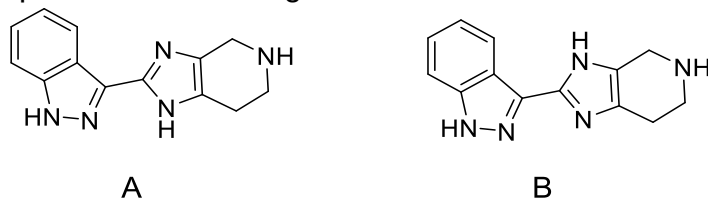
En algunas realizaciones, A^3 se selecciona del grupo que consiste en:



En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consiste en metilo, isopropilo y propilo, y A^3 se selecciona del grupo que consiste en:



Además, la porción imidazol de la porción tetrahydroimidazopiridina existe en formas tautoméricas, ilustradas a continuación para un fragmento de los compuestos de la divulgación.



Según la convención de la IUPAC, estas representaciones dan lugar a una numeración diferente de los átomos de la porción imidazol: (1*H*-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-*c*]piridina (estructura A) frente a (1*H*-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahydro-3H-imidazo[4,5-*c*]piridina (estructura B). Se comprenderá que, aunque las estructuras se muestren o se nombren en una forma particular, la invención también incluye el tautómero de estas.

Los compuestos de la divulgación pueden contener uno o más centros quirales y, por lo tanto, dichos compuestos (y productos intermedios de estos) pueden existir como mezclas racémicas; estereoisómeros puros (es decir, enantiómeros o diastereómeros); mezclas enriquecidas por estereoisómeros y similares. Los compuestos quirales que se muestran o se nombran en el presente documento sin una estereoquímica en un centro quiral tienen el propósito de incluir todas o cualquier variación posible del estereoisómero en el estereocentro indefinido a menos que se indique lo contrario. El hecho de representar o nombrar un estereoisómero particular significa que el estereocentro indicado tiene la estereoquímica designada y debe

comprenderse que las cantidades menores de los estereoisómeros también pueden estar presentes a menos que se indique de otra manera, siempre y cuando la utilidad del compuesto representado o nombrado no se elimine con la presencia de otro estereoisómero.

Los compuestos de la divulgación también pueden contener varios grupos básicos (p. ej., grupos amino) y, por lo tanto, dichos compuestos pueden existir como base libre o en diversas formas de sales, tales como una forma de sal monoprotonada, una forma de sal diprotonada, una forma de sal triprotonada, o mezclas de estas. Todas estas formas están incluidas dentro del alcance de esta invención, a menos que se indique lo contrario.

Esta invención también incluye compuestos etiquetados de forma isotópica de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV'), es decir, compuestos de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV') donde uno o más átomos se ha reemplazado o enriquecido con un átomo que tiene el mismo número atómico, pero una masa diferente de la masa atómica que predomina en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse a un compuesto de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV') incluyen, a mero título enunciativo, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O . Son de particular interés los compuestos de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV') enriquecidos con tritio o carbono-14, dichos compuestos se pueden usar, por ejemplo, en estudios de distribución de tejidos. También son de particular interés los compuestos de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV') enriquecidos con deuterio especialmente en un lugar de metabolismo, compuestos que se espera que tengan una mayor estabilidad metabólica. Además, son de particular interés los compuestos de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) y (IV') enriquecidos con un isótopo emisor de positrones, tal como ^{11}C , ^{15}O y ^{13}N , compuestos que se pueden usar, por ejemplo, en estudios de Tomografía por emisión de positrones (PET).

Definiciones

Cuando se describe esta invención incluidos sus diferentes aspectos y realizaciones, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario.

El término “alquilo” significa un grupo de hidrocarburo saturado monovalente que puede ser lineal o derivado, o combinaciones de estos. A menos que se defina de otro modo, dichos grupos alquilo en general contienen de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos de 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-dimetilopropilo, 2-metilobutilo, 3-metilobutilo, 2-etilobutilo, 2,2-dimetilopentilo, 2-propilpentilo y similares.

Cuando un número específico de átomos de carbono está previsto para un término en particular, el número de átomos de carbono se muestra después del término. Por ejemplo, el término “alquilo C₁₋₃” significa un grupo alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono donde los átomos de carbono están en cualquier configuración químicamente aceptable, incluidas configuraciones lineales o ramificadas.

El término “cicloalquilo” significa grupo carbocíclico saturado monovalente que puede ser monocíclico o multicíclico. A menos que se defina de otro modo, dichos grupos cicloalquilos en general contienen de 3 a 10 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo representativos incluyen, a título de ejemplo, ciclopropilo (cPr), ciclobutilo (cBu), ciclopentil, ciclohexil, cicloheptilo, ciclooctilo, adamantilo y similares.

El término “cpropilo” significa ciclopropilo.

El término “heterociclilo”, “heterociclo”, “heterocíclico” o “anillo heterocíclico” significa un grupo cíclico no aromático monovalente saturado o parcialmente insaturado que tiene de 3 a 10 átomos de anillo totales, donde el anillo contiene de 2 a 9 átomos de anillo de carbono y de 1 a 4 heteroátomos

de anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y sulfuro. Los grupos heterocíclicos pueden ser monocíclicos o multicíclicos (es decir, fusionados o enlazados). Los grupos heterocíclicos representativos incluyen, a título de ejemplo, pirrolidinil, piperidinil, piperazinil, imidazolidinil, morfolinil, tiomorfolil, indolin-3-il, 2-imidazolinil, tetrahidropiranil, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-il, quinuclidinil, 7-azanorbornanil, nortropanil y similares, donde el punto de adhesión está en cualquier átomo de anillo disponible de carbono o nitrógeno. En donde el contexto pone en evidencia el punto de adhesión del grupo heterocíclico, dichos grupos se pueden denominar de manera alternativa como una especie no valente, es decir pirrolidina, piperidina, piperazina, imidazol, tetrahidropirano, etc.

El término “halo” significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para el tratamiento cuando se administra a los pacientes que necesitan el tratamiento.

El término “tratar” o “tratamiento” significa prevenir, mejorar o suprimir la afección, enfermedad o trastorno médico que se está tratando (p. ej., una enfermedad respiratoria) en un paciente (particularmente un ser humano); o aliviar los síntomas de la afección, enfermedad o trastorno médico.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” significa una sal que es aceptable para la administración a un paciente o a un mamífero, tal como un ser humano (p. ej., sales que tienen de seguridad aceptable para mamíferos para un régimen de dosificación dado). Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen sales de ácido acético, ascórbico, bencenosulfónico, benzoico, camforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, edisílico, fumárico, gentísico, glucónico, glucurónico, glutámico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, istioniónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mucico, 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 de estos” significa un compuesto formado cuando el hidrógeno de un ácido se reemplaza por un catión, tal como un catión de metal o un catión orgánico y similares. Por ejemplo, el catión puede ser una forma protonada de un compuesto de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) o (IV'), es decir una forma donde uno o más grupos amino se han protonado mediante un ácido. En general, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales de compuestos intermedios que no se administrarán a un paciente.

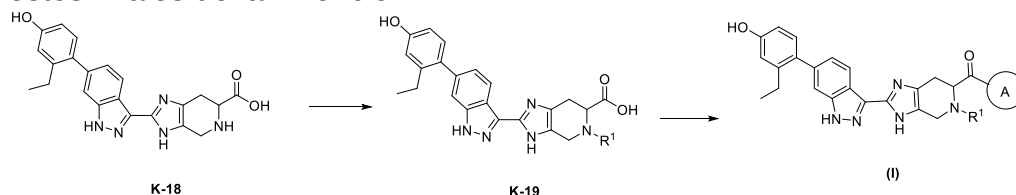
Procedimientos generales de síntesis

Los compuestos de esta invención, y los productos intermedios de estos, se pueden preparar según los siguientes métodos y procedimientos generales mediante materiales de partida y reactivos disponibles comercialmente o que se preparan de rutina. Los sustituyentes y las variables (p. ej., A, R¹, R², R³, etc.) que se usan en los siguientes esquemas tienen los mismos significados que los definidos en otra parte del presente documento, a menos que se indique lo contrario. Además, los compuestos que tienen un átomo ácido o básico o un grupo funcional se pueden usar o se pueden producir como una sal, a menos que se indique lo contrario (en algunos casos, el uso de una sal en una reacción particular requerirá la conversión de la sal a una forma que no sea una sal, p. ej., una base libre, usando procedimientos de rutina antes de llevar a cabo la reacción).

Aunque se puede mostrar o describir una realización particular de la presente invención en los siguientes procedimientos, los expertos en la técnica reconocerán que otras realizaciones o aspectos de la presente invención también se pueden preparar mediante dichos procedimientos o usando otros métodos, reactivos y materiales de partida conocidos para los expertos en la técnica. En particular, se apreciará que los compuestos de la invención se

puedan preparar mediante una variedad de vías del proceso en las cuales los reactivos se combinan en diferentes órdenes para proporcionar diferentes productos intermedios de camino a producir los productos finales.

En el siguiente esquema se ilustra un método general de preparación de compuestos finales de la invención.



El compuesto **K-18** se hace reaccionar con una cetona o aldehído en presencia de un agente reductor para proporcionar el compuesto de fórmula **K-19**. Luego, el compuesto **K-19** se hace reaccionar con amina A en condiciones típicas de formación de enlaces de amida para obtener el compuesto (I). Normalmente, el ácido carboxílico se pone en contacto con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 equivalentes de amina A en presencia de un exceso de base. La reacción de formación de enlace de amida puede utilizar agentes de acoplamiento, tales como hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio (HATU) u otros agentes de acoplamiento de amida conocidos en la técnica. Se puede agregar hidrazina para escindir subproductos no deseados. En general, la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 24 horas o hasta que la reacción se completa sustancialmente.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención y las sales farmacéuticamente aceptables de estos en general se usan en la forma de una composición farmacéutica o formulación. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar ventajosamente a un paciente por inhalación. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier vía de

administración aceptable que incluyen, a mero título enunciativo, vías de administración oral, rectal, nasal, tópica (incluida transdérmica) y parenteral.

En consecuencia, en uno de los aspectos de la composición, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) o (IV'), donde, como se ha definido anteriormente, "compuesto de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) o (IV')" significa un compuesto de la fórmula (I), (I'), (II), (II'), (III), (III'), (IV) o (IV') o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación, si así se desea. Al analizar las composiciones y los usos de estas, el "compuesto de la invención" también se puede denominar "agente activo" en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de la invención" pretende incluir todos los compuestos abarcados por la fórmula (I) así como las especies incluidas en la fórmula (I) y las sales farmacéuticamente aceptables de este.

Las composiciones farmacéuticas de la invención en general contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, composiciones a granel, o menos que una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para varias administraciones para lograr una cantidad terapéuticamente eficaz.

En general, dichas composiciones farmacéuticas contendrán de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 95% en peso del agente activo; incluido, por ejemplo, de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 30% en peso; y de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 10% en peso del agente activo.

Cualquier portador o excipiente convencional se puede usar en las composiciones farmacéuticas de la invención. La elección de un portador o excipiente en particular, o de combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se usa para tratar a un paciente particular o el tipo de afección médica o estado de la enfermedad. Con respecto a esto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo de administración particular se encuentra bien dentro del alcance de los expertos en las técnicas farmacéuticas. Adicionalmente, los vehículos o excipientes usados en las composiciones farmacéuticas de esta invención están disponibles en el mercado. A modo de ilustración adicional, las técnicas de formulación convencionales se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams y White, Baltimore, Maryland (2000); y H.C. Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams y White, Baltimore, Maryland (1999).

Los ejemplos de materiales representativos que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, a mero título enunciativo: 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 semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; tampones, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico;

soluciones tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas en general se preparan al mezclar o combinar minuciosa e íntimamente el agente activo con un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. La mezcla combinada uniformemente resultante luego se puede moldear o cargar en comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, usando procedimientos y equipos convencionales.

En un aspecto, la composición farmacéutica es adecuada para la administración por inhalación. En general, las composiciones farmacéuticas para administración por inhalación se encuentran en forma de aerosol o polvo. Dichas composiciones en general se administran mediante dispositivos de administración por inhalador, tales como un inhalador de polvo seco (DPI), un inhalador de dosis medida (MDI), un inhalador nebulizador o un dispositivo de administración parecido.

En una realización particular, la composición farmacéutica se administra por inhalación mediante un inhalador de polvo seco. Dichos inhaladores de polvo seco en general administran la composición farmacéutica como un polvo de flujo libre que se dispersa en la corriente de aire del paciente durante la inspiración. Para lograr una composición de polvo de flujo libre, el agente terapéutico se formula típicamente con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico (PLA), polilactida-co-glicólido (PLGA) o combinaciones de estos. En general, el agente terapéutico se microniza y se combina con un portador adecuado para formar una composición adecuada para inhalación.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador de polvo seco comprende lactosa y un compuesto de la invención en forma micronizada. Una composición de polvo seco de este tipo se puede preparar, por ejemplo, al combinar lactosa molida en seco con el agente

terapéutico y luego mezclar en seco los componentes. Luego, normalmente, la composición se carga en un dispensador de polvo seco o en cartuchos o cápsulas de inhalación para su uso con un dispositivo de suministro de polvo seco.

Los dispositivos de suministro de inhalador de polvo seco adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación se describen en la técnica y existen ejemplos de dichos dispositivos disponibles comercialmente. Por ejemplo, los productos o dispositivos de suministro de inhaladores de polvo seco representativos incluyen Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Ellipta (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); y similares.

En otra realización particular, la composición farmacéutica se administra por inhalación mediante un inhalador de dosis medida. Dichos inhaladores de dosis medida en general descargan una cantidad medida de un agente terapéutico mediante un gas propelente comprimido. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas administradas mediante un inhalador de dosis medida comprenden típicamente una solución o suspensión del agente terapéutico en un propelente licuado. Se puede emplear cualquier propelente licuado adecuado, incluidos los hidrofluoroalcanos (HFA), tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-*n*-propano (HFA 227); y clorofluorocarbonos, tales como CCl₃F. En una realización particular, el propelente es un hidrofluoroalcano. En algunas realizaciones, la formulación de hidrofluoroalcano contiene un codisolvente, tal como etanol o pentano, y/o un tensioactivo, tal como trioleato de sorbitán, ácido oleico, lecitina y glicerol.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador de dosis medida comprende de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 5% en peso de un compuesto de la invención; de aproximadamente 0% a aproximadamente 20% en peso de etanol; y de aproximadamente 0% a aproximadamente 5% en peso de tensioactivo; el resto es un propulsor de HFA. En general, dichas composiciones se preparan al añadir hidrofluoroalcano enfriado o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente terapéutico, etanol (si está presente) y el tensioactivo (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente terapéutico se microniza y luego se combina con el propelente. Luego, la composición se carga en un depósito de aerosol, que normalmente forma una parte de un dispositivo inhalador de dosis medida.

Los dispositivos inhaladores de dosis medida adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación se describen en la técnica y existen ejemplos de dichos dispositivos disponibles comercialmente. Por ejemplo, los productos o dispositivos inhaladores de dosis medida representativos incluyen AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals); Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M); Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline); y similares.

En otro aspecto particular, la composición farmacéutica se administra por inhalación mediante un inhalador nebulizador. Dichos dispositivos nebulizadores en general producen una corriente de aire a alta velocidad que hace que la composición farmacéutica se pulverice como un vapor que se transporta a las vías respiratorias del paciente. Por consiguiente, cuando se formula para su uso en un inhalador nebulizador, el agente terapéutico se puede disolver en un portador adecuado para formar una solución. Alternativamente, el agente terapéutico puede micronizarse o nanomolizarse y combinarse con un portador adecuado para formar una suspensión.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador nebulizador comprende una solución o suspensión que comprende de aproximadamente 0,05 µg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de un compuesto de la invención y excipientes compatibles con las formulaciones nebulizadas. En una realización, la solución tiene un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 8.

Los dispositivos nebulizadores adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación se describen en la técnica y existen ejemplos de dichos dispositivos disponibles comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos o productos nebulizadores representativos incluyen el Respimat Softmist Inhalaler (Boehringer Ingelheim); el AERx Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.); el PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH); y similares.

En otro aspecto más, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar alternativamente en una forma farmacéutica prevista para administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden tener forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas, sellos, 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, o similares; cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo.

Cuando están previstas para administración oral en una forma farmacéutica sólida, las composiciones farmacéuticas de la invención en general comprenderán el agente activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico. Opcional o alternativamente, dichas formas farmacéuticas sólidas también pueden comprender: rellenos o extensores, aglutinantes, hidratantes, agentes retardadores de la solución, aceleradores de la absorción, humectantes, absorbentes, lubricantes, colorantes y tampones. Los agentes de liberación, los

humectantes, los agentes de recubrimiento, endulzantes, saborizantes y aromatizantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Las formulaciones alternativas también pueden incluir formulaciones de liberación controlada, formas farmacéuticas líquidas para administración oral, parches transdérmicos y formulaciones parenterales. Los excipientes y métodos de preparación convencionales de dichas formulaciones alternativas se describen, por ejemplo, en la referencia de Remington, *supra*.

Los siguientes ejemplos, a mero título enunciativo, muestran las composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención.

Composición de polvo seco

Se mezcla un compuesto micronizado de la fórmula (I) (1 g) con lactosa molida (25 g). Luego, esta mezcla combinada se carga en blísteres individuales de un paquete de blíster despegable en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4 mg del compuesto de la fórmula I por dosis. El contenido de los blísteres se administra con un inhalador de polvo seco.

Composición de polvo seco

Se mezcla un compuesto micronizado de la fórmula (I) (1 g) con lactosa molida (20 g) para formar una composición a granel que tiene una proporción por peso del compuesto respecto de la lactosa molida de 1:20. La composición mezclada se envasa en un dispositivo para inhalación de polvo seco que puede administrar aproximadamente de 0,1 mg a aproximadamente 4 mg del compuesto de la fórmula I por dosis.

Composición del inhalador de dosis fija

Se dispersa un compuesto micronizado de la fórmula (I) (10 g) en una solución que se prepara al disolver lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 mL). La suspensión resultante se atomiza en seco y luego se microniza para formar una composición micronizada que comprende partículas con un

diámetro medio menor de aproximadamente 1,5 μm . La composición micronizada luego se carga en los cartuchos del inhalador de dosis fija que contiene 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado en una cantidad suficiente para brindar de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4 mg del compuesto de la fórmula I por dosis cuando se administra con el inhalador de dosis fija.

Composición del nebulizador

Se disuelve un compuesto de la fórmula (I) (25 mg) en una solución que contiene de 1,5 a 2,5 equivalentes de ácido clorhídrico, y luego se agrega hidróxido de sodio para ajustar el pH a entre 3,5 y 5,5 y 3% por peso de glicerol. La solución se revuelve bien hasta que todos los componentes estén disueltos. La solución se administra con un dispositivo nebulizador que brinda de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 4 mg del compuesto de la fórmula (I) por dosis.

Utilidad

Los inhibidores de JAK de la invención se diseñaron para el tratamiento contra la enfermedad inflamatoria y fibrótica de las vías respiratorias. En particular, los compuestos se diseñaron para permitir la administración de un potente agente contra las citocinas directamente al lugar de acción de la enfermedad respiratoria en el pulmón, mientras que se limita la exposición sistémica.

Se demostró que los compuestos de la invención son inhibidores potentes de la familia de enzimas JAK: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Además, se demostró que los compuestos tienen inhibición potente de la citocina proinflamatoria y profibrótica. Se reconoce que el efecto antiinflamatorio amplio de los inhibidores de JAK podría deprimir la función celular inmunitaria normal, lo que a su vez podría producir un aumento en el riesgo de infección. Por lo tanto, se optimizó a los compuestos presentes a fin de limitar la absorción desde el pulmón hacia el plasma y de este modo minimizar el riesgo de inmunodepresión.

Como se describe en la sección experimental a continuación, se trazaron los perfiles de la absorción y la distribución de compuestos típicos en los ensayos preclínicos. Se evaluó a los compuestos **1** a **6** en ratones y se demostró que a las 5 horas después de la dosificación tienen concentración alta en el tejido pulmonar y baja absorción en el plasma. Se demostró que los compuestos de la invención inhiben un efecto de la citocina proinflamatoria IL-13 en el tejido pulmonar de los ratones. De forma específica, con los compuestos se demostró la inhibición de la fosforilación de STAT6 inducida por IL-13 en el tejido pulmonar, lo que proporciona pruebas de que la JAK a la que se dirige el compuesto en el pulmón a nivel local se acopla *in vivo*. Este efecto se observó cuando se administra la citocina proinflamatoria IL-13 4 horas después de la administración del compuesto de prueba, lo que brinda más pruebas de la retención significativa en el pulmón.

Se demostró que los compuestos evaluados exhiben tanto actividad inhibitoria potente a nivel celular como retención significativa en el tejido pulmonar. Mediante la vasta investigación realizada por los inventores presentes, se determinó que, aunque es posible identificar compuestos potentes a nivel celular o compuestos que muestren retención significativa en el pulmón, resulta mucho más difícil descubrir compuestos que exhiban ambas características deseables al mismo tiempo.

La actividad antiinflamatoria de los inhibidores de JAK se demostró de forma robusta en modelos preclínicos de asma (Malaviya et al., *Int. Immunopharmacol.*, **2010**, 10, 829-836; Matsunaga et al., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **2011**, 404, 261-267; Kudlacz et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, 582, 154-161). Las citocinas implicadas en la inflamación por asma que envían señales a través de la vía de JAK-STAT incluyen IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, linfopoyetina estromal tímica (TSLP), interferón- γ (IFN γ) y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). Por lo tanto, se espera que los

compuestos de la invención sean útiles para el tratamiento de los trastornos respiratorios inflamatorios, en particular, del asma. La inflamación y la fibrosis del pulmón son características de otras enfermedades respiratorias además del asma tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la fibrosis quística (CF), la neumonitis, las enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática), la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la bronquitis, el enfisema, la bronquiolitis obliterante y la sarcoidosis. Por consiguiente, se espera que los compuestos presentes también sean útiles para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la fibrosis quística, la neumonitis, las enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática), la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la bronquitis, el enfisema, la bronquiolitis obliterante y la sarcoidosis.

Cuando se compara con los análogos de fluoro correspondientes (compuestos **C-1**, **C-2**, **C-3**, **C-4**, **C-5** y **C-6**), se demostró que los compuestos **1** a **6** presentan actividad similar de JAK. Sin embargo, tienen la ventaja de dar lugar a un metabolismo mediante sulfatación significativamente menor, como se demuestra en el Ensayo 5. Esto es significativo ya que el metabolismo mediante sulfatación se produce en los pulmones, lo que puede causar una disminución rápida de la exposición al compuesto activo original.

Se demostró que los compuestos de la divulgación producen inhibición de las citocinas asociadas con la inflamación. Por consiguiente, es probable que los compuestos de la divulgación sean útiles para el tratamiento de determinadas enfermedades respiratorias específicas, como se detalla a continuación.

La inflamación eosinofílica de las vías respiratorias es un rasgo característico de las enfermedades que se denominan de forma conjunta enfermedades eosinofílicas pulmonares (Cottin et al., *Clin. Chest. Med.*, **2016**, 37(3), 535-56). Se asoció a las enfermedades eosinofílicas con la señalización

mediante IL-4, IL-13 e IL-5. Entre las enfermedades eosinofílicas pulmonares se incluyen infecciones (en especial, infecciones helmínticas), neumonitis inducidas por medicamentos (inducidas por ejemplo por medicamentos terapéuticos como antibióticos, fenitoína o l-triptófano), neumonitis fúngicas (p. ej., aspergilosis broncopulmonar alérgica), neumonitis por hipersensibilidad y granulomatosis eosinofílica con poliangitis (que antes se conocía síndrome de Churg-Strauss). Entre las enfermedades eosinofílicas pulmonares cuya etiología es conocida, se incluyen la neumonía eosinofílica idiopática aguda, la neumonía eosinofílica idiopática crónica, el síndrome hipereosinofílico y el síndrome de Löffler.

Se asoció un polimorfismo del gen IL-6 con aumentos de los niveles de IL-6 y aumento del riesgo de presentar hipertensión arterial pulmonar (PAH) (Fang et al., *J. Am. Soc. Hypertens.*, **2017**, 11(3), 171-177). La inhibición de la gp130 de cadena receptora de la IL-6 alivió la enfermedad en un modelo con ratas de PAH (Huang et al., *Can. J. Cardiol.*, **2016**, 32(11), 1356.e1-1356.e10), lo que corrobora el papel de la IL-6 en la PAH.

Se implicó a las citocinas, tales como IFN γ , IL-12 e IL-6, en una variedad de enfermedades pulmonares que no son alérgicas, tales como la sarcoidosis y la linfangioleiomiomatosis (El-Hashemite et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2005**, 33, 227-230 y El-Hashemite et al., *Cancer Res.*, **2004**, 64, 3436-3443). También se demostró que los compuestos de la invención inhiben la señalización por IFN- γ .

La bronquiectasia y las enfermedades pulmonares infiltrativas están asociadas con la inflamación neutrofílica crónica.

La activación patológica de células T es fundamental en la etiología de varias enfermedades respiratorias. Las células T autorreactivas participan en la bronquiolitis obliterante mediante la organización de la neumonía (también denominada COS). De forma similar a la COS, la etiología de los rechazos de trasplante pulmonar está vinculada a una activación aberrante de las células T

del receptor causada por el pulmón trasplantado del donante. Los rechazos de trasplantes de pulmón pueden ocurrir temprano como disfunción primaria del injerto (PGD), neumonía organizada (OP), rechazo agudo (AR) o bronquiolitis linfocítica (LB) o pueden ocurrir años después del trasplante como disfunción crónica del aloinjerto pulmonar (CLAD). La CLAD se conocía anteriormente como bronquiolitis obliterante (BO), pero ahora se considera un síndrome que puede tener diferentes manifestaciones patológicas, incluidas BO, CLAD restrictiva (rCLAD o RAS) y disfunción neutrofílica del aloinjerto. La disfunción crónica del aloinjerto pulmonar (CLAD) es un desafío importante en el manejo a largo plazo de los receptores de un trasplante pulmonar ya que hace que el pulmón trasplantado pierda de forma progresiva su funcionalidad (Gauthier et al., *Curr Transplant Rep.*, **2016**, 3(3), 185–191). La CLAD responde al tratamiento de forma deficiente y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de compuestos eficaces capaces de prevenir o tratar esta afección. Varias citocinas dependientes de JAK, tales como IFN γ e IL-5, están reguladas al alza en la CLAD y el rechazo de trasplante de pulmón (Berastegui et al., *Clin. Transplant.* **2017**, 31, e12898). Además, las altas concentraciones pulmonares de quimiocinas CXCR3, tales como CXCL9 y CXCL10, que se encuentran secuenciadas abajo de la señalización de IFN dependiente de JAK, están vinculadas a peores resultados en pacientes con trasplante de pulmón (Shino et al., *PLOS One*, **2017**, 12 (7), e0180281). Se ha demostrado que la inhibición sistémica de JAK es eficaz en el rechazo de trasplantes de riñón (Vicenti et al., *American Journal of Transplantation*, **2012**, 12, 2446-56). Por lo tanto, los inhibidores de JAK tienen el potencial de ser eficaces para tratar o prevenir el rechazo de trasplante de pulmón y CLAD. Los eventos de activación de células T parecidos a los descritos como base para el rechazo del trasplante de pulmón también se consideran el principal impulsor de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) pulmonar que puede presentarse después de los trasplantes de células madre hematopoyéticas. Al igual que la CLAD, la GVHD

pulmonar es una afección crónica progresiva con resultados extremadamente desfavorables y en la actualidad no se han aprobado tratamientos. Un estudio por encuesta, multicéntrico, retrospectivo de 95 pacientes con GVHD aguda o crónica resistente a los esteroides que recibieron el inhibidor sistémico de JAK ruxolitinib como terapia de rescate demostró una respuesta completa o parcial a ruxolitinib en la mayoría de los pacientes, incluidos aquellos con GVHD pulmonar (Zeiser *et al*, *Leukemia*, **2015**, 29, 10, 2062-68). Como la inhibición sistémica de JAK se asocia con eventos adversos graves y un índice terapéutico pequeño, sigue siendo necesario un inhibidor de JAK no sistémico, inhalado, dirigido a los pulmones, para prevenir y/o tratar el rechazo del trasplante de pulmón o la GVHD pulmonar. Los compuestos de la divulgación tienen las características necesarias para cumplir con esta necesidad. De forma más reciente, con el aumento en el uso de inhibidor de puntos de control inmunitario, surgió la neumonitis inducida por inhibidores de puntos de control inmunitario, otra enfermedad pulmonar mediada por las células T. Los pacientes con cáncer tratados con estos agentes estimulantes de las células T pueden contraer neumonitis mortal.

En un aspecto, por lo tanto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad respiratoria en un mamífero (p. ej., un ser humano), el método que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En un aspecto, la enfermedad respiratoria es asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, neumonitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística (CF), neumonitis, enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda,

bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterante o sarcoidosis. En otro aspecto, la enfermedad respiratoria es el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En un aspecto, la enfermedad respiratoria es una infección pulmonar, una enfermedad eosinofílica, una infección helmíntica, hipertensión arterial pulmonar, sarcoidosis, linfangioleiomiomatosis, bronquiectasia, una enfermedad pulmonar infiltrativa, neumonitis inducida por medicamentos, neumonitis fúngica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, granulomatosis eosinofílica con poliangitis, neumonía eosinofílica aguda idiopática, neumonía eosinofílica idiopática crónica, síndrome hipereosinofílico, síndrome de Löffler, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada y rechazos agudos y crónicos de trasplante pulmonar (incluidos PGD, OP, LB, AR y CLAD, BO, CLAD restrictiva y disfunción neutrofílica del aloinjerto), enfermedad del injerto contra el huésped pulmonar, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada, hipertensión arterial pulmonar, bronquiectasia o neumonitis inducida por inhibidores de puntos de control inmunitario.

La invención da a conocer además un método para tratar el asma en un mamífero, el método que comprende la administración al mamífero de una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Cuando se usan para tratar el asma, los compuestos de la divulgación, en general, se administrarán en una sola dosis diaria o en varias dosis por día, aunque se pueden usar otras formas de administración. La cantidad del agente activo administrado por dosis o la cantidad total administrada por día suele estar determinada por un médico en función de las circunstancias relevantes, que incluyen, a mero título enunciativo, el trastorno que se va a tratar, la vía de

administración elegida; el compuesto realmente administrado y su actividad relativa; la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, además de la gravedad de los síntomas del paciente.

La invención da a conocer además un método para tratar una enfermedad respiratoria (incluida la enfermedad descrita en el presente documento, a mero título ilustrativo) en un mamífero, el método que comprende la administración al mamífero de una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Cuando se usan para tratar una enfermedad respiratoria (incluida la enfermedad descrita en el presente documento, a mero título ilustrativo), los compuestos de la divulgación, en general, se administrarán en una sola dosis diaria o en varias dosis por día, aunque se pueden usar otras formas de administración. La cantidad del agente activo administrado por dosis o la cantidad total administrada por día suele estar determinada por un médico en función de las circunstancias relevantes, que incluyen, a mero título enunciativo, el trastorno que se va a tratar, la vía de administración elegida; el compuesto realmente administrado y su actividad relativa; la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, además de la gravedad de los síntomas del paciente.

Como inhibidores de JAK, es posible que los compuestos de la divulgación también sean útiles contra una diversidad de otras enfermedades. Los compuestos de la divulgación pueden ser útiles para una variedad de indicaciones gastrointestinales inflamatorias que incluyen, a mero título enunciativo, la enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis ulcerosa (proctosigmoiditis, pancolitis, proctitis ulcerosa y colitis izquierda), la enfermedad de Crohn, la colitis colagenosa, la colitis linfocítica, la enfermedad

de Behcet, la enfermedad celíaca, la colitis inducida por el inhibidor de puntos de control inmunitario, la ileítis, la esofagitis eosinofílica, la colitis relacionada con la enfermedad del injerto contra el huésped y la colitis infecciosa. La colitis ulcerosa (Reimund et al., *J. Clin. Immunology*, **1996**, 16, 144-150), la enfermedad de Crohn (Woywodt et al., *Eur. J. Gastroenterology Hepatology*, **1999**, 11, 267-276), la colitis colagenosa (Kumawat et al., *Mol. Immunology*, **2013**, 55, 355-364), la colitis linfocítica (Kumawat et al., **2013**), la esofagitis eosinofílica (Weinbrand-Goichberg et al., *Immunol. Res.*, **2013**, 56, 249-260), la colitis relacionada con la enfermedad del injerto contra el huésped (Coghill et al., *Blood*, **2001**, 117, 3268-3276), la colitis infecciosa (Stallmach et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, **2004**, 19, 308-315), la enfermedad de Behcet (Zhou et al., *Autoimmun. Rev.*, **2012**, 11, 699-704), la enfermedad celíaca (de Nitto et al., *World J. Gastroenterol.*, **2009**, 15, 4609-4614), la colitis inducida por inhibidores de puntos de control inmunitario (p. ej., la colitis inducida por el inhibidor de CTLA-4 [Yano et al., *J. Translation Med.*, **2014**, 12, 191] o la colitis inducida por el inhibidor de PD-1 o PD-L1) y la ileítis (Yamamoto et al., *Dig. Liver Dis.*, **2008**, 40, 253-259) se caracterizan por un aumento en los niveles de determinadas citocinas proinflamatorias. Puesto que muchas citocinas proinflamatorias señalizan a través de la activación de la JAK, los compuestos descritos en esta aplicación pueden ser capaces de aliviar la inflamación y proporcionar alivio del síntoma. En particular, los compuestos de la divulgación pueden ser útiles para la inducción y el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa, y para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, de la colitis inducida por el inhibidor de puntos de control inmunitario y de los efectos adversos gastrointestinales en la enfermedad del injerto contra el huésped. En un aspecto, por lo tanto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad gastrointestinal inflamatoria en un mamífero (p. ej., un ser humano), el método que comprende la administración al mamífero de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que

comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

La dermatitis atópica y otras enfermedades cutáneas inflamatorias se han asociado con una elevación de las citocinas proinflamatorias que dependen de la vía de la JAK-STAT. Por consiguiente, es posible que los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, sean beneficiosos en una serie de afecciones dérmicas inflamatorias o pruriginosas que incluyen, a mero título enunciativo, la dermatitis atópica, la alopecia areata, el vitiligo, la psoriasis, la dermatomiositis, el linfoma cutáneo de células T (Netchiporouk et al., *Cell Cycle*, **2014**; *13*, 3331-3335) y subtipos (síndrome de Sezary, micosis fungoide, reticulosis patoide, piel laxa granulomatosa, papulosis linfomatoide, pitiriasis liquenoide crónica, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, linfoma cutáneo de células T CD30+, linfoma cutáneo secundario de células grandes CD30+, linfoma cutáneo de células T grandes sin micosis fungoide CD30–, linfoma pleomórfico de células T, linfoma de Lennert, linfoma subcutáneo de células T, linfoma angiocéntrico, linfoma blástico de linfocitos T citotóxicos), prurigo nodular, liquen plano, amiloidosis cutánea primaria localizada, penfigoide ampolloso, manifestaciones cutáneas de la enfermedad del injerto contra el huésped, penfigoide, lupus discoide, granuloma anular, liquen simple crónico, prurito vulvar/escrotal/perianal, liquen escleroso, picazón por neuralgia posherpética, liquen plano pilar y foliculitis decalvante. En particular, la dermatitis atópica (Bao et al., *JAK-STAT*, **2013**, *2*, e24137), alopecia areata (Xing et al., *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1043-1049), vitiligo (Craiglow et al., *JAMA Dermatol.* **2015**, *151*, 1110-1112), el prurigo nodular (Sonkoly et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 411-417), 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 penfigoide ampollar (Feliciani et al., *Int J. Immunopathol. Pharmacol.* **1999**, *12*, 55-61) y las manifestaciones cutáneas de la enfermedad del injerto contra el

huésped (Okiyama et al., *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134*, 992-1000) se caracterizan por una elevación de determinadas citocinas que señalizan a través de la activación de la JAK. En consecuencia, los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, pueden ser capaces de aliviar la inflamación dérmica asociada o el prurito que provocan estas citocinas. En particular, se puede esperar que los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, sean útiles para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades cutáneas inflamatorias. En un aspecto, por lo tanto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad cutánea inflamatoria en un mamífero (p. ej., un ser humano), el método comprende la aplicación de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador farmacéutico en la piel del mamífero. En un aspecto, la enfermedad cutánea inflamatoria es dermatitis atópica.

Muchas enfermedades oculares han demostrado estar asociadas con elevaciones de las citocinas proinflamatorias que dependen de la vía de la JAK-STAT. Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, por lo tanto, pueden ser útiles para el tratamiento de varias enfermedades oculares que incluyen, a mero título enunciativo, uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad del ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad y queratoconjuntivitis atópica. En particular, la uveítis (Horai and Caspi, *J. Interferon Cytokine Res.*, **2011**, *31*, 733-744), la retinopatía diabética (Abcouwer, *J. Clin. Cell. Immunol.*, **2013**, *Suppl 1*, 1-12), el edema macular diabético (Sohn et al., *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, *152*, 686-694), la enfermedad del ojo seco (Stevenson et al., *Arch. Ophthalmol.*, **2012**, *130*, 90-100) y la degeneración macular relacionada con la edad (Knickerbein et al., *Int. Ophthalmol. Clin.*, **2015**, *55*(3), 63-78) se caracterizan por una elevación de determinadas citocinas proinflamatorias que señalizan a través de la vía de JAK-STAT. En

consecuencia, los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, pueden ser capaces de aliviar la inflamación ocular asociada y revertir la progresión de la enfermedad o proporcionar alivio de los síntomas. En un aspecto, por lo tanto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad ocular en un mamífero, el método comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador farmacéutico al ojo del mamífero. En un aspecto, la enfermedad ocular es uveítis, retinopatía diabética, edema macular diabético, enfermedad del ojo seco, degeneración macular relacionada con la edad o queratoconjuntivitis atópica. En un aspecto, el método comprende la administración del compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, mediante inyección intravítrea. Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos útiles para tratar las enfermedades oculares.

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, también pueden ser útiles para tratar otras enfermedades tales como otras enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias o tipos de cáncer. Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, puede ser útil para tratar una o más de las siguientes enfermedades: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, rechazo de trasplante, xeroftalmia, artritis psoriásica, diabetes, diabetes insulino dependiente, enfermedad de la motoneurona, síndrome mielodisplásico, dolor, sarcopenia, caquexia, choque séptico, lupus eritematoso sistémico, leucemia, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, espondilitis anquilosante, mielofibrosis, linfoma de linfocitos B, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de mama, mieloma múltiple, melanoma,

linfoma no hodgkiniano, carcinoma broncopulmonar no microcítico, carcinoma de ovario de células transparentes, tumor de ovario, tumor de páncreas, policitemia vera, síndrome de Sjogrens, sarcoma de tejido blando, sarcoma, esplenomegalia, linfoma de linfocitos T y talasemia grave.

Tratamiento combinado

Los compuestos de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de estos también se pueden usar en combinación con uno o más agentes que funcionan mediante el mismo mecanismo o mediante mecanismos diferentes para tratar una enfermedad. Los diferentes agentes pueden administrarse de forma secuencial o simultánea, en composiciones separadas o en la misma composición. Entre las clases útiles de agentes para terapia de combinación se incluyen, a mero título enunciativo, un agonista del receptor adrenérgico beta-2, una antagonista de los receptores muscarínicos, una agonista de los glucocorticoides, un antagonista del receptor 44 acoplado a proteínas G, un antagonista del leucotrieno D4, un antagonista del receptor muscarínico M3, un antagonista del receptor de histamina H1, un antagonista de la inmunoglobulina E, un inhibidor de PDE 4, un antagonista de la IL-4, un antagonista del receptor muscarínico M1, un antagonista de los receptores de histamina, un antagonista de la IL-13, un antagonista de la IL-5, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa, un agonista beta-adrenoceptor, un antagonista de la quimiocina CCR3, un estimulador del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), un modulador de la inmunoglobulina, un inhibidor del ligando de la interleucina 33, un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE) 3, un inhibidor de la fosfoinositida-3-cinasa delta, un antagonista de tromboxano A2, un inhibidor de elastasa, un inhibidor de la tirosina cinasa Kit, un antagonista del leucotrieno E4, un antagonista de los leucotrienos, un antagonista de la prostaglandina D2 (PGD2), un inhibidor del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, un agente de unión al TNF, un inhibidor de la cascada del complemento, un inhibidor del ligando de

eotaxina, un inhibidor de la glutatión reductasa, un antagonista del receptor de histamina H4, un antagonista de la IL-6, un estimulador del gen de IL-2, un modulador del receptor IIB del Fc de la inmunoglobulina gamma, un ligando del interferón gamma, un inhibidor del ligando de la interleucina 13, un inhibidor del ligando de la interleucina 17, un antagonista de la L-selectina, un inhibidor de la elastasa de los leucocitos, un antagonista del leucotrieno C4, un inhibidor de la leucotrieno-C4-sintasa, un inhibidor de la amina oxidasa que contiene cobre de membrana, un inhibidor de la metaloproteasa-12, un inhibidor de la metaloproteasa-9, un modulador de los alérgenos ácaros, un modulador de los receptores muscarínicos, un agonista de los receptores de la acetilcolina nicotínica, un inhibidor del factor kappa B nuclear, un antagonista de la p-selectina, un inhibidor de la PDE 5, un antagonista del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un inhibidor de la fosfoinositida-3-cinasa gamma, un agonista del TLR-7, un antagonista del TNF, un inhibidor de la Abl tirosina cinasa, un antagonista del receptor de la acetilcolina, un inhibidor de la quitinasa ácida de mamíferos, un agonista del receptor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), un modulador de la polimerización de la actina, un antagonista de los receptores de adenosina A1, un estimulador de la adenilato ciclase, un antagonista de los receptores adrenérgicos, un ligando de la hormona adrenocorticotropa, un inhibidor de la alcohol deshidrogenasa 5, un estimulador de alfa-1-antitripsina, un inhibidor de la alfa-1-proteinasa, un modulador de los receptores androgénicos, un estimulador de la enzima 2 convertidora de angiotensina, un agonista del péptido natriurético auricular (ANP), un inhibidor de la proteína Bcr, un antagonista del receptor adrenérgico beta 1, un antagonista del receptor adrenérgico beta 2, un modulador del receptor adrenérgico beta 2, un modulador amiloide beta, un inhibidor del gen BMP10, un inhibidor del gen BMP15, un inhibidor de los canales de calcio, un inhibidor de la catepsina G, un inhibidor del gen CCL26, un modulador de la quimiocina CCR3, un antagonista de la quimiocina CCR4, un inhibidor de las

moléculas de adhesión celular, un estimulador de las chaperoninas, un inhibidor de las chitininasas, un antagonista de colágeno I, un inhibidor del complemento C3, un antagonista de CSF-1, un antagonista de la quimiocina CXCR2, un modulador de la cadena beta común de receptores de citocinas, un estimulador de la proteína 4 de los linfocitos T citotóxicos, un estimulador de la desoxirribonucleasa I, un estimulador de las desoxirribonucleasas, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa I, un inhibidor de la DNAgirasa, un modulador del receptor prostanoide DP, un antagonista de la E-selectina, un inhibidor del receptor de las tirosina cinasas de la familia de EGFR, un modulador de la elastina, un antagonista de la Endotelina ET-A, un antagonista de la Endotelina ET-B, un inhibidor de la epóxido hidrolasa, un antagonista del receptor FGF3, un inhibidor de la tirosina cinasa de Fyn, un inhibidor del factor de transcripción GATA 3, un modulador de la glucosilceramidasa, un modulador del receptor de glutamato, un inhibidor del ligando de GM-CSF, un estimulador de la guanilato ciclasa, un inhibidor de H⁺ K⁺ ATPasa, un modulador de la hemoglobina, un agonista de la heparina, un inhibidor de la histona desacetilasa, un estimulador de la histona desacetilasa-2, un inhibidor de la HMG CoA reductasa, un inhibidor de la cinasa beta I-kappa, un inhibidor del gen ICAM1, un antagonista de la IL-17, un modulador del receptor de la IL-17, un antagonista de la IL-23, un modulador del receptor de la IL-4, un modulador de la inmunoglobulina G, un agonista de la inmunoglobulina G1, un modulador de la inmunoglobulina G, un antagonista del receptor IA del Fc de la inmunoglobulina épsilon, un antagonista del receptor IIB del Fc de la inmunoglobulina gamma, un modulador de la inmunoglobulina kappa, un sensibilizador de insulina, un ligando del interferón beta, un antagonista del receptor similar a la interleucina 1, un inhibidor del ligando de la interleucina 18, un antagonista del receptor de la interleucina 17A, un inhibidor del ligando de la interleucina-1 beta, un inhibidor del ligando de la interleucina-5, un inhibidor del ligando de la interleucina-6, un inhibidor del canal 3 de potasio dependiente del voltaje

KCNA, un inhibidor del ligando Kit, un agonista de la laminina-5, un antagonista del receptor de leucotrieno CysLT1, un antagonista del receptor de leucotrieno CysLT2, un inhibidor del gen LOXL2, un inhibidor de la Lin tirosina cinasa, un inhibidor de la proteína MARCKS, un inhibidor de la 4 asociada a MDR, un modulador de la metaloproteasa-2, un modulador de la metaloproteasa-9, un antagonista de los receptores mineralocorticoides, un antagonista del receptor muscarínico M2, un antagonista del receptor muscarínico M4, un antagonista del receptor muscarínico M5, un agonista del receptor del péptidos natriurético A, un modulador del receptor de linfocitos citolíticos naturales, un estimulador de la subunidad alfa 7 del receptor ACh nicotínico, un modulador de los receptores de los linfocitos citolíticos, un modulador del factor kappa B nuclear, un agonista de los receptores del factor de crecimiento opioide, un inhibidor de la glucoproteína P, un antagonista del receptor purinérgico P2X3, un inhibidor de la MAP cinasa p38, un modulador de la peptidasa 1, un inhibidor de la fosfolipasa A2, un inhibidor de la fosfolipasa C, un inhibidor del inhibidor 1 del activador del plasminógeno 1, un antagonista de los receptores del factor activador de plaquetas, un agonista de los PPAR gamma, un agonista de las prostaciclina, un inhibidor de las proteínas tirosina cinasas, un estimulador de la inositol fosfatasa 1 de dominio SH2, un inhibidor de la transducción de señales, un inhibidor de los canales de sodio, un modulador de STAT-3, un inhibidor del antígeno-1 de las células madre, un modulador de la superóxido dismutasa, un inhibidor de las glucoproteínas CD28 de la superficie de los linfocitos T, un inhibidor de las glucoproteínas CD8 de la superficie de los linfocitos T, un agonista del factor de crecimiento transformante (TGF) beta, un antagonista del TGF beta, un inhibidor de la tromboxano sintetasa, un inhibidor del ligando de la linfoproteína estromal tímica, un agonista de la timosina, un ligando de la timosina beta 4, un agonista del TLR-8, un agonista del TLR-9, un estimulador del gen TLR-9, un inhibidor de la topoisomerasa IV, un estimulador de la troponina I musculoesquelética rápida, un estimulador de la troponina T

musculoesquelética rápida, un antagonista de los receptores de la IL-1 de tipo I, un modulador de los receptores del TNF de tipo II, un modulador de los canales iónicos, un estimulador de la uteroglobina y un agonista del péptido vasoactivo intestinal (VIP).

Entre los agentes específicos que pueden utilizarse en combinación con los presentes compuestos inhibidores de JAK se incluyen, a mero título enunciativo, acetato de rosiptor, bromuro de umeclidinio, secukinumab, acetato de metencefalina, acetato de tridecactida, propionato de fluticasona, sulforafano estabilizado con ciclodextrina alfa, tezepelumab, furoato de mometasona, BI-1467335, dupilumab, aclidini, formoterol, AZD-1419, HI-1640V, rivipansel, CMP-001, mannitol, ANB-020, omalizumab, tregalizumab, Mitizax, benralizumab, golimumab, roflumilast, imatinib, REGN-3500, masitinib, apremilast, RPL-554, Actimmune, adalimumab, rupatadina, parogrelil, MK-1029, dipropionato de beclometasona, fumarato de formoterol, mogamulizumab, seratrodast, UCB-4144, nemiralisib, CK-2127107, fevipiprant, danirixina, bosentán, abatacept, EC-18, duvelisib, dociparstat, ciprofloxacina, salbutamol HFA, erdosteína, PrEP-001, nedocromil, CDX-0158, salbutamol, enobosarm, R-TPR-022, lenzilumab, furoato de fluticasona, trifenatato de vilanterol, propionato de fluticasona, salmeterol, PT-007, PRS-060, remestemcel-L, citrulina, RPC-4046, óxido nítrico, DS-102, gerilimzumab, Actair, furoato de fluticasona, umeclidinio, vilanterol, AG-NPP709, Gamunex, infliximab, Ampion, acumapimod, canakinumab, INS-1007, CYP-001, sirukumab, propionato de fluticasona, mepolizumab, pitavastatina, solitromicina, etanercept, ivacaftor, anakinra, MPC-300-IV, bromuro de glicopirronio, bromuro de aclidinio, FP-025, risankizumab, glicopirronio, fumarato de formoterol, Adipocell, YPL-001, bromuro de tiotropio, bromuro de glicopirronio, maleato de indacaterol, andecaliximab, olodaterol, esomeprazol, vacuna contra los ácaros del polvo, vacuna contra los alérgenos del polen de la artemisa, vamorolona, gefapixant, revefenacina, gefitinib, ReJoin, tipelukast, bedoradrina, SCM-CGH,

SHP-652, RNS-60, brodalumab, BIO-11006, bromuro de umeclidinio, trifenatato de vilanterol, bromuro de ipratropio, tralokinumab, PUR-1800, VX-561, VX-371, olopatadina, tulobuterol, fumarato de formoterol, acetónido de triamcinolona, reslizumab, xinafoato de salmeterol, propionato de fluticasona, dipropionato de beclometasona, fumarato de formoterol, bromuro de tiotropio, ligelizumab, RUTI, bertilimumab, omalizumab, bromuro de glicopirronio, SENS-111, dipropionato de beclometasona, CHF-5992, LT-4001, indacaterol, bromuro de glicopirronio, furoato de mometasona, fexofenadina, bromuro de glicopirronio, azitromicina, AZD-7594, formoterol, CHF-6001, batefenterol, OATD-01, olodaterol, CJM-112, rosiglitazona, salmeterol, setipirant, interferón beta inhalado, AZD-8871, plecanatida, fluticasona, salmeterol, monoglicéridos del ácido eicosapentaenoico, lebrikizumab, RG-6149, QBKPN, mometasona, indacaterol, AZD-9898, piruvato de sodio, zileutón, CG-201, imidafenacina, CNTO-6785, CLBS-03, mometasona, RGN-137, procaterol, formoterol, CCI-15106, POL-6014, indacaterol, beclometasona, MV-130, GC-1112, Allergovac depot , MEDI-3506, QBW-251, ZPL-389, udenafilo, GSK-3772847, levocetirizina, AXP-1275, ADC-3680, timapiprant, abediterol, AZD-7594, bromuro de ipratropio, sulfato de salbutamol, tadekinig alfa, ACT-774312, dornasa alfa, iloprost, batefenterol, furoato de fluticasona, alicaforsen, ciclesonida, emeramida, arformoterol, SB-010, Ozagrel, BTT-1023, dectrekumab, levalbuterol, pranlukast, ácido hialurónico, GSK-2292767, formoterol, NOV-14, Lucinactant, salbutamol, prednisolona, ebastina, cipeclato de dexametasona, GSK-2586881, BI-443651, GSK-2256294, VR-179, VR-096, hdm-ASIT+, budesonida, GSK-2245035, VTX-1463, emedastina, dexpramipexol, levalbuterol, N-6022, fosfato sódico de dexametasona, PIN-201104, OPK-0018, TEV-48107, suplatast, BI-1060469, Gemilukast, interferón gamma, dalazatida, bilastina, propionato de fluticasona, xinafoato de salmeterol, RP-3128, bromuro de bencicloquidio, reslizumab, PBF-680, antagonista de CRTH2, Pranlukast, xinafoato de salmeterol, propionato de

fluticasona, bromuro de tiotropio monohidrato, masilukast, RG-7990, doxofilina, abediterol, bromuro de glicopirronio, TEV-46017, ASM-024, propionato de fluticasona, bromuro de glicopirronio, xinafoato de salmeterol, salbutamol, TA-270, flunisolida, cromoglucato de sodio, Epsi-gam, ZPL-521, salbutamol, aviptadil, TRN-157, Zafirlukast, Stempeucel, pemirolast sódico, nadolol, propionato de fluticasona + xinafoato de salmeterol, RV-1729, sulfato de salbutamol, dióxido de carbono + bromuro de perfluorooctilo, APL-1, dectrekumab + VAK-694, acetilsalicilato de lisina, zileutón, TR-4, terapia con células progenitoras mesenquimales derivadas de tejido adiposo alógeno humano, MEDI-9314, PL-3994, HMP-301, TD-5471, NKTT-120, pemirolast, dipropionato de beclometasona, trantinterol, luminol alfa monosódico, IMD-1041, AM-211, TBS-5, ARRY-502, seratrodist, midismasa recombinante, ASM-8, deflazacort, bambuterol, RBx-10017609, ipratropio + fenoterol, fluticasona + formoterol, epinastina, WIN-901X, VALERGEN-DS, OligoG-COPD-5/20, tulobuterol, oxis Turbuhaler, DSP-3025, ASM-024, mizolastina, budesonida + salmeterol, LH-011, AXP-E, histamina-inmunoglobulina humana, YHD-001, teofilina, ambroxol + erdoesteína, ramatroban, montelukast, pranlukast, AG-1321001, tulobuterol, ipratropio + salbutamol, tranilast, suleptanato de metilprednisolona, daropato de colforsina, repirinast y doxofilina.

También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más otros agentes terapéuticos. El agente terapéutico puede seleccionarse a partir de las clases de agentes especificadas anteriormente y de la lista de agentes específicos descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es idónea para administrar a los pulmones. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es idónea para la administrar de forma inhalada o mediante nebulización. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un polvo seco o una composición líquida.

Además, en un aspecto del método, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más otros agentes terapéuticos.

Cuando se usa en el tratamiento de combinación, los agentes se pueden formular en una única composición farmacéutica o los agentes se pueden proporcionar en composiciones separadas que se administran de forma simultánea o en momentos separados, por las mismas o diferentes vías de administración. Dichas composiciones se pueden empaquetar por separado o se pueden empaquetar juntas como un kit. Los dos agentes terapéuticos o más en el kit se pueden administrar por la misma vía de administración o mediante diferentes vías de administración.

EJEMPLOS

Se ofrecen los siguientes ejemplos sintéticos y biológicos para ilustrar la invención, y no están formulados de ninguna forma para limitar el alcance de la invención. En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. Las abreviaturas no definidas a continuación tienen los significados generalmente aceptados.

ACN	=	acetonitrilo	
DCM	=	diclorometano	
DIPEA	=	<i>N,N</i> -diisopropiletiloamina	
DMF	=	<i>N,N</i> -dimetilformamida	
EtOAc	=	acetato de etilo	
h	=	horas	
HATU	=	hexafluorofosfato	de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilo-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio
IPA	=	alcohol isopropílico	

IPAc = isopropilacetato

MeOH= metanol

min = minutos

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ = tetraquis(trifenilfosfin)paladio(0)

TA = temperatura ambiente

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

bis(pinacolato)diborón = 4,4,5,5,4',4',5',5'-octametil-[2,2']bi[[1,3,2]dioxaborolanilo]

Se adquirieron los reactivos y solventes de proveedores comerciales (Aldrich, Fluka, Sigma, etc.) y se usaron sin purificación adicional. Se monitoreó la evolución de las mezclas de reacción mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución analítica (HPLC analítica) y espectrometría de masas. Se analizaron las mezclas de reacción como se describe específicamente en cada reacción; con frecuencia se purificaron mediante la extracción y otros métodos de purificación tal como cristalización dependiente de la temperatura y del solvente y precipitación. Además, las mezclas de reacción se purifican de rutina mediante la cromatografía en columna o mediante la HPLC preparativa, en general usando C18 o rellenos de columna de BDS y en eluyentes convencionales. Las condiciones para la HPLC preparativa típica son las que se describen a continuación.

Se llevó a cabo la caracterización de los productos de reacción mediante espectrometría de masas y ^1H -NMR. Para el análisis de NMR, se disolvieron las muestras en solvente deuterado (tal como CD_3OD , CDCl_3 o d_6 -DMSO), y se adquirió un espectro de NMR con H^1 con un instrumento Varian Gemini 2000 (400 MHz) en condiciones de observación estándar. La identificación por espectrometría de masas de los compuestos se realizó mediante un método de ionización de electrospray (ESMS) con un instrumento Applied Biosystems

(Foster City, CA) del modelo API 150 EX o un instrumento Waters (Milford, MA) 3100, acoplado con sistemas de autopurificación.

Condiciones preparativas de HPLC

Columna: C18, 5 μ m; 21,2 $\times$ 150 mm o C18, 5 μ m 21 $\times$ 250 o C14, 5 μ m 21 $\times$ 150 mm

Temperatura de la columna: Temperatura ambiente

Caudal: 20,0 mL/min

Fases móviles: A = agua + 0,05% TFA

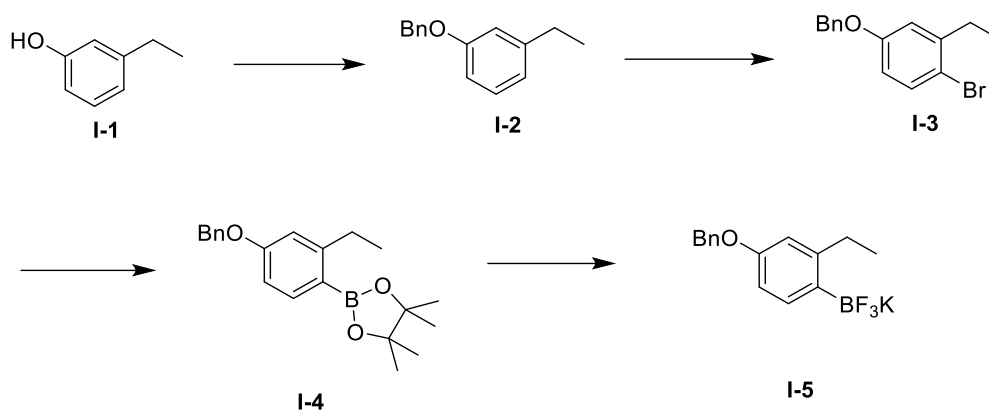
B = ACN + 0,05% TFA

Volumen de inyección: (100-1500 μ L)

Longitud de onda para la detección: 214 nm

Los compuestos sin procesar se disolvieron en agua:ácido acético 1:1 a aproximadamente 50 mg/mL. Se llevó a cabo una operación de prueba a escala analítica de 4 minutos usando una columna de C18 de 2,1 mm $\times$ 50 mm seguida de una operación a escala preparativa de 15 o 20 minutos usando una inyección de 100 μ L con el gradiente basado en la retención del % B de la operación de prueba a escala analítica. Los gradientes exactos dependieron de la muestra. Las muestras con impurezas de pirogenación cercanas se controlaron con una columna de 21 $\times$ 250 mm C18 y/o con una columna de 21 $\times$ 150 mm C14 para una mejor separación. Las fracciones que contienen el producto deseado se identificaron mediante el análisis de espectrometría de masas.

Preparación 1: 4-(benciloxi)-2-etilfenil)trifluoro- λ^4 -borano, sal de potasio I-5



(a) 1-(benziloxy)-3-etilbenceno (**I-2**)

A una solución agitada de 3-etilfenol (**I-1**) (25,0 g, 204,0 mmol) en ACN (250 mL, 10 vol) se le agregó carbonato de potasio (42,0 g, 306 mmol) a temperatura ambiente. La masa de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido por la adición de bromuro de bencilo (24,0 mL, 204 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de reacción resultante se vertió en agua (1,0 L) seguido por la extracción del compuesto con EtOAc (2 $\times$ 2 L). Los orgánicos combinados se lavaron con agua fría, solución de salmuera y se secaron en sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. Luego se purificó el producto crudo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 2% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado (**I-2**) como un compuesto aceitoso amarillo claro (35,0 g, 81%). ^1H NMR (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,46-7,44 (m, 2H), 7,39 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,34-7,31 (m, 1H), 7,21 (t, J = 7,6 Hz), 6,86-6,80 (m, 3H), 5,07 (s, 2H), 2,64 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,24 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

(b) 4-(benciloxi)-1-bromo-2-etilbenceno (**I-3**)

A una solución agitada helada de 1-(benciloxi)-3-etilbenceno (**I-2**) (35,0 g, 164 mmol) en ACN (525 mL, 15 vol) se agregó N-bromosuccinimida (32,0 g, 181 mmol) en porciones durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una

vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de reacción resultante se vertió en agua helada (1,50 L) seguido por la extracción del compuesto con EtOAc (2 × 1 L). Los orgánicos combinados se lavaron con agua y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y evaporaron a presión reducida para obtener el producto crudo. Se agregó n-hexano (250 mL) al material crudo, lo que dio como resultado una suspensión, seguida por filtración a través de un embudo sintetizado. Se evaporó el licor madre a presión reducida para obtener el producto deseado **I-3** como un compuesto aceitoso amarillo claro (42,0 g, 87%). ^1H NMR (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,52-7,29 (m, 7H), 6,88 (s, 1H), 6,68 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 5,04 (s, 2H), 2,69 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,20 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

(c) 2-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano

(I-4)

Una solución agitada de 4-(benciloxi)-1-bromo-2-etilbenceno (**I-3**) (42,0 g, 144 mmol), bis(pinacolato) diboron (44,0 g, 173 mmol), y acetato de potasio (28 g, 288 mmol) en dioxano (440 mL) se desgasificó mediante la purga de N_2 (g) durante 15 min seguida por la adición del complejo $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{DCM}$ (11,0 g, 15 mmol). La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las siguientes 16 h. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), se filtró la reacción a través de un lecho de celite y se evaporó el licor madre a presión reducida para obtener el producto crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 1% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado (**I-4**) como un compuesto aceitoso amarillo claro (32,0 g, 66%). ^1H NMR (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,74 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,45-7,36 (m, 5H), 6,84-6,78 (m, 2H), 5,08 (s, 2H), 2,91 (q, J = 7,6 Hz), 1,33 (s, 12H), 1,19 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

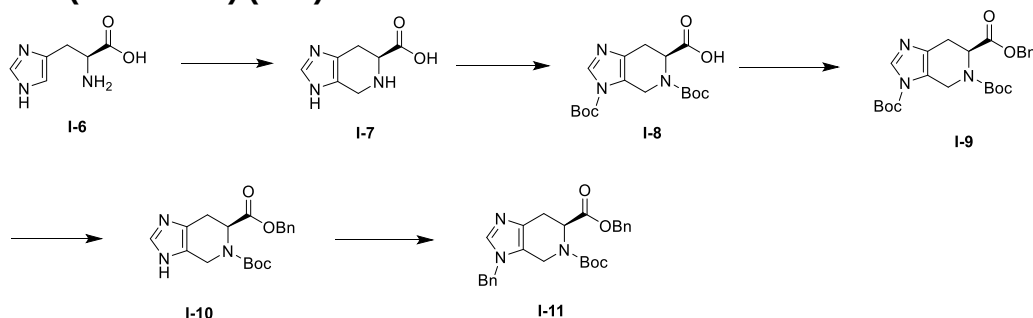
(d) 4-(benciloxi)-2-etilfenil)trifluoro- λ^4 -borano, sal de potasio (**I-5**)

A una solución agitada del compuesto 2-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (**I-4**) (20 g, 59,0 mmol), en acetona:metanol (200 mL, relación 1:1, 10 vol), se le agregó una solución 3 M de fluoruro de hidrógeno de potasio (23,0 g, 295 mmol, disuelta en 98,0 mL de agua). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de reacción resultante se evaporó a presión reducida. El sólido obtenido de este modo se disolvió en agua (100 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La masa de reacción resultante se filtró a través de un embudo sintetizado, se lavó con n-hexano y se secó a presión reducida para proporcionar el producto deseado (**I-5**) como un sólido blanco (14,0 g, 74%). ¹H NMR (400 MHz, Cloroformo-d) δ 7,43 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,37 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 7,30 (t, J = 7,1 Hz, 1H), 7,22 (d, J = 8,0 Hz), 6,58 (s, 1H), 6,53 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 2,65 (q, J = 7,5 Hz, 2H), 1,07 (t, J = 7,4 Hz, 3H).

Preparación

2:

(S)-3-bencil-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(tert-butilo) (**I-11**)



(a) sal de hidrocloreuro del ácido

(S)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (**I-7**)

A una suspensión agitada helada de L-histidina (**I-6**) (5,0 kg, 32,14 mol) en agua (40 L, 8 vol.) se le agregó ácido clorhídrico concentrado (3,93 L, 33,75 mol), seguido por la adición de formaldehído (5,50 L, 67,5 mol, 37% solución acuosa) gota a gota. La solución resultante se agitó durante

30 minutos a la misma temperatura y luego se calentó a 80 °C durante 8 horas. Se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS. Se eliminó el agua a presión reducida para obtener el producto crudo, y el crudo resultante se agitó durante 2 horas en tolueno (20 L). Los orgánicos se eliminaron a presión reducida para eliminar el exceso de agua y el compuesto secó azeotrópicamente. El material resultante se metió en éter dietílico (20 L) y se agitó durante 2 horas. El material sólido se filtró y se secó al aire para obtener el producto deseado **(I-7)** como un sólido blanquecino (6,50 kg, 85%). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8,69 (s, 1H), 4,56 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 4,42 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 4,20 (dd, J = 5,5, 5,2 Hz, 1H), 3,42 (dd, J = 5,0, 17,0 Hz, 1H), 3,11 (dd, J = 10,2, 16,8 Hz, 1H).

(b) ácido

(S)-3,5-bis(*tert*-butoxicarbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico **(I-8)**

A una solución agitada helada de dihidrocloruro de ácido (S)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico **(I-7)** (6,10 kg, 25,40 mol) en 1,4-dioxano (48 L, 8 vol) y agua (48 L, 8 vol) se le agregó trietilamina (12,36 L, 89 mol) gota a gota, seguida por la adición de dicarbonato de di-*tert*-butilo (18,07 L, 78,74 mol, disuelto en 5 L de 1,4-dioxano) durante un período de 30 min. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante las siguientes 16 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC y LCMS), la mezcla de reacción amarillenta se diluyó con agua (10 L) y se lavó sucesivamente con éter dietílico (2 × 10 L) y EtOAc (2 × 7,50 L). Se descartó la fase orgánica. La capa acuosa se enfrió y se llevó a pH ~3 con solución de HCl 6 N; la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 × 10 L). Los orgánicos combinados se lavaron con solución de salmuera, se secaron en sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida. El material aceitoso se cristalizó a partir de EtOAc:Hexanos al 30% para obtener el

producto deseado **(I-8)** como un sólido blanquecino (5,1 kg, 55%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₅N₃O₆ 368,18, hallado 368,21.

(c) (S)-6,7-dihidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-3,5,6(4H)-tricarboxilato de 6-bencil 3,5-di-*tert*-butilo **(I-9)**

A una solución helada de ácido (S)-3,5-bis(tert-butoxicarbonil)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico **(I-8)** (5,1 kg, 13,88 mol) en DCM (51 L, 10 vol) se agregaron secuencialmente bicarbonato de sodio acuoso saturado (41,0 L, 8 vol), yoduro de tetra-butilamonio (5,13 kg, 13,88 mol) y bromuro de bencilo (2,47 L, 20,82 mol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante las siguientes 16 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC y LCMS), se separó la solución bifásica. La capa acuosa se extrajo con DCM (3 × 10 L). Los orgánicos combinados se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para obtener el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna a través de gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 40% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado **(I-9)** como aceite viscoso (4,50 kg, 72%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₃₁N₃O₆ 458,22, hallado 458,60.

(d) (S)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) **(I-10)**

A una solución helada de (S)-6,7-dihidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-3,5,6(4H)-tricarboxilato de 6-bencil 3,5-di-*tert*-butilo **(I-9)** (4,50 kg, 9,84 mol) en IPA (45 L, 10 vol) se le agregó hidróxido de amonio (36 L, 8 vol) gota a gota. La mezcla de reacción resultante se agitó más a temperatura ambiente durante las siguientes 16 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC y LCMS), la mezcla resultante se diluyó con agua (25 L) seguida por la extracción con EtOAc (3 × 20 L). Los orgánicos combinados se lavaron con solución de salmuera, se

secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para rendir el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna a través de gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 2% MeOH en DCM para obtener el producto deseado **(I-10)** como aceite viscoso espeso (2,70 kg, 77%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₂₃N₃O₄ 358,17, hallado 358,33.

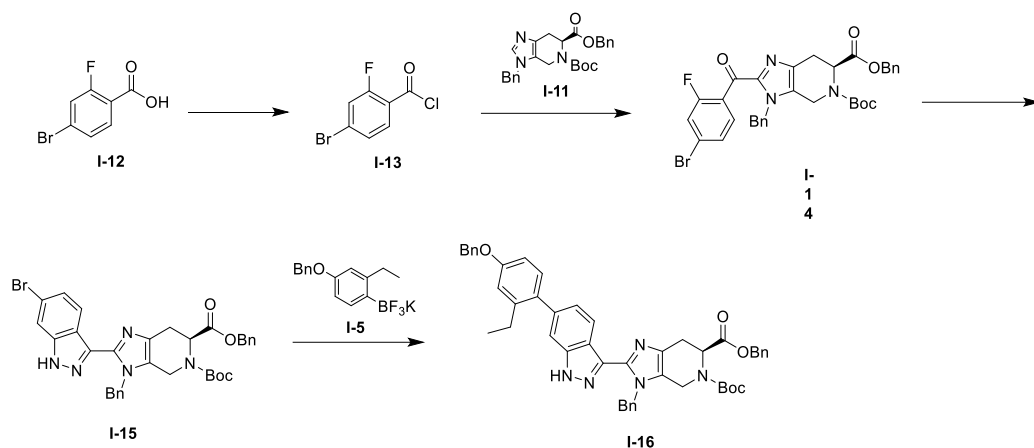
(e) (S)-3-bencil-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) **(I-11)**

A una solución helada de (S)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) **(I-10)** (2,70 kg, 7,55 mol) en DCM (32,4 L, 12 vol) se le agregó hidróxido de sodio acuoso 1 N (24,3 L, 9 vol) seguido por la adición secuencial de yoduro de tetra-butilamonio (2,80 kg, 7,55 mol) y bromuro de bencilo (0,99 L, 8,31 mol). La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC y LCMS), se separó la solución bifásica. La capa acuosa se extrajo con DCM (3 × 10 L). Los orgánicos combinados se lavaron con solución de salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para rendir el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 40% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado **(I-11)** como un aceite viscoso (1,70 kg, 63%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₆H₂₉N₃O₄ 448,22, hallado 448,20.

Preparación

3:

(S)-3-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-1H-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (I-16)



(a) cloruro de 4-bromo-2-fluorobenzoílo (**I-13**)

A una solución agitada helada de ácido 4-bromo-2-fluorobenzoico (**I-12**) (1,25 kg, 5,71 mol) en DCM (12,5 L, 15 vol), se agregó cloruro de oxalilo (0,98 L, 11,42 mol) gota a gota. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 10 minutos a la misma temperatura. Luego se agregó DMF (150 mL) gota a gota a la mezcla de reacción. La masa de reacción resultante se dejó que se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), se eliminó el exceso de cloruro de oxalilo a presión reducida en una atmósfera de nitrógeno para obtener el producto crudo (**I-13**) (1,08 kg, 80%), el cual se utilizó en el siguiente paso sin otra purificación.

(b) (S)-3-bencil-2-(4-bromo-2-fluorobenzoil)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-14**)

A una solución agitada de (S)-3-bencil-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-11**) (1,70 kg, 3,80 mol) en ACN (13,6 L, 8 vol) se le agregó trietilamina (2,11 L, 15,2 mol) seguida por la adición de cloruro de 4-bromo-2-fluorobenzoílo (**I-13**) (1,08 kg, 4,56 mol en 3,4 L ACN, 2 vol) a temperatura ambiente. Al finalizar la adición, el color de la mezcla de reacción resultante cambió de amarillo claro a marrón. La mezcla de reacción resultante se agitó a la misma temperatura durante 30 minutos y el progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC. La mezcla de reacción resultante se

desactivó con agua helada (10 L), seguida por la extracción con EtOAc (3 × 5 L) y los orgánicos combinados se lavaron con solución de salmuera. Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para rendir el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 20% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado (**I-14**) (1,74 kg, 71%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₃H₃₁BrFN₃O₅ 648,14, hallado 648,20.

(c) (S)-3-bencil-2-(6-bromo-1H-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-15**)

A una solución agitada de (S)-3-bencil-2-(4-bromo-2-fluorobenzoil)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-14**) (1,74 kg, 2,68 mol) en THF (26,0 L, 15 vol) se le agregó hidrato de hidrazina (0,705 L, 13,4 mol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 3 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC), la masa de reacción resultante se vertió en agua helada (10 L) seguido por la extracción del compuesto con EtOAc (3 × 10 L). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para rendir el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 20% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado (**I-15**) como un sólido blanquecino (1,12 kg, 65%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₃H₃₂BrN₅O₄ 642,16, hallado 642,21.

(d) (S)-3-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-1H-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-16**)

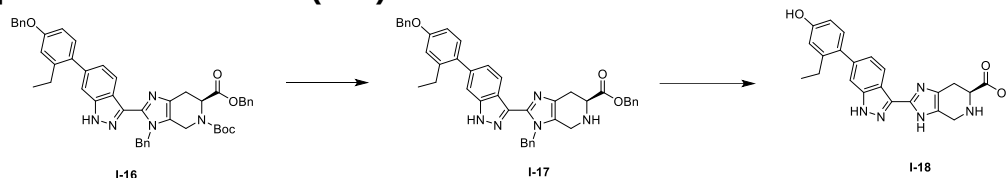
Bis(pinacolato)diboron (250 g, 984 mmol) se cargó en un matraz de pared simple, de 3 cuellos y de 5 L previamente grabado utilizando la química

del fluoruro, junto con propan-2-ol (1,882 L, $2,46\text{E}+04$ mmol) y la mezcla de agitó hasta que se completó la disolución. La solución fue endotérmica ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). En un matraz Erlenmeyer de 4 L, previamente grabado utilizando la química del fluoruro, se disolvió hidrófluoruro de potasio y fluoruro (538 g, 6891 mmol) en agua (2,306 L, $1,28\text{E}+05$ mmol) para formar una solución 3 M. La disolución fue endotérmica ($-12\text{ }^{\circ}\text{C}$). Luego se filtró la solución para eliminar una cantidad pequeña de material insoluble del hidrófluoruro de potasio y fluoruro. Una vez que ambas soluciones se disolvieron por completo, los contenidos del matraz Erlenmeyer se cargaron en el matraz de pared simple en porciones durante 15 minutos. Se observó una exotérmica moderada ($+10\text{ }^{\circ}\text{C}$). La solución se volvió una suspensión gris, semiopaca, translúcida y espesa durante la adición, y se aumentó la agitación para mantener bien mezclados los contenidos. La mezcla se agitó durante 1,5 h, luego se la filtró a través de un embudo de vidrio fritado de porosidad gruesa (4 L, previamente grabado). La filtración necesitó de 30 minutos a 45 minutos para completarse. Se descartó el filtrado transparente bifásico. Los sólidos blancos se secaron durante 10 minutos en el filtro (se observó agrietamiento de la torta). Se transfirieron los sólidos a un matraz de pared simple, de 3 cuellos y de 5 L limpio y se volvió a crear la suspensión con agua (1,33 L, $7,38\text{E}+04$ mmol). Se agitó la suspensión durante 2 h, después de transcurrido este tiempo, se formó un hidrogel homogéneo transparente. La solución se agitó durante 1 h más, tras lo cual los sólidos y el gel se filtraron utilizando un embudo de vidrio de porosidad gruesa de 4 L (previamente grabado). Se dejó que los sólidos se secaran en el filtro durante 30 minutos. Se transfirieron los sólidos a un matraz de pared simple, de 3 cuellos y de 5 L limpio y se volvió a crear la suspensión con acetona (1,084 L, $1,48\text{E}+04$ mmol). La suspensión blanca y gris se agitó durante 1 h y luego se la filtró en un embudo de vidrio, de porosidad gruesa y de 4 L (previamente grabado). La filtración necesitó 20 minutos para completarse y luego se la secó en el embudo durante 1 h más. Durante este tiempo, se agitó ocasionalmente

los sólidos para asegurar un secado homogéneo. Después del secado, en el filtró quedó un polvo blanco claro. Se secaron los sólidos durante 20 h a 55 °C al vacío con una purga lenta de nitrógeno para obtener un sólido blanco esponjoso (se recogieron 200,3 g).

A una solución agitada de (S)-3-bencil-2-(6-bromo-1H-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]píridin-5,6-dicarboxilato de 6-bencil 5-(*tert*-butilo) (**I-15**) (10,0 g, 16,0 mmol) en 2-metil tetrahidrofurano (100 mL, 10 vol) se le agregó (4-(benciloxi)-2-etilfenil)trifluoro- λ^4 -borano, sal de potasio (**I-5**) (8,0 g, 20 mmol) y el sólido blanco esponjoso obtenido anteriormente (0,20 g). La mezcla de reacción resultante se desgasificó con gas de nitrógeno durante 30 minutos. A esta solución, se agregó una solución acuosa preparada de carbonato de cesio (20,0 g, 62,0 mmol en 60 mL de agua, 6 vol) La mezcla de reacción resultante se volvió a desgasificar durante 15 minutos seguido por la adición de bis(di-*tert*-butil(4-dimetilaminofenil)fosfina)dicloropaladio(II) (0,66 g, 0,93 mmol), la mezcla de reacción se evacuó al vacío y se purgó mediante nitrógeno. La mezcla de reacción resultante se calentó a 110 °C durante 20 horas. Una vez finalizada la reacción (monitoreada mediante TLC y LCMS), la mezcla de reacción resultante se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de celite, luego se volvió a lavar con EtOAc (3 × 0,5 L). Se lavaron los orgánicos combinados con solución de hidróxido de sodio 1 N (3 x0,5 L). Luego, los orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a presión reducida para rendir el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (100 M a 200 M) mediante el uso de eluyentes 20% EtOAc en hexano para obtener el producto deseado (**I-16**) (como una mezcla de regioisómeros de N-bencil) como un sólido amarillo claro (8,0 kg, 66%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₄₈H₄₇N₅O₅ 774,36, hallado 774,59.

Preparación 4: hidrocloreto de ácido (S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (I-18)



(a) hidrocloreto de (S)-3-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxilato de bencilo (I-17)

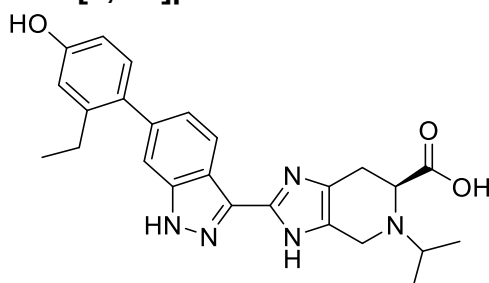
(S)-3-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-1H-indazol-3-il)-3,4,6,7-tetrahidro-5H-imidazo[4,5-c]piridin-5,6-dicarboxilato de 6-Bencil 5-(*tert*-butilo) (I-16) (1,0 g, 1,292 mmol) se disolvió en dioxano (8 mL) y agua (1,5 mL), luego se agregó solución de cloruro de hidrógeno 4 M en dioxano (7 mL, 28,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Luego, la mezcla de reacción se congeló y liofilizó, y el producto crudo (I-17) se utilizó directamente en la siguiente reacción (se supuso un rendimiento cuantitativo). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₄₃H₃₉N₅O₃ 674,31, hallado 674,3.

(b) hidrocloreto de ácido (S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (I-18)

hidrocloreto de (S)-3-bencil-2-(6-(4-(benciloxi)-2-etilfenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxilato de bencilo (I-17) (0,918 g, 1,292 mmol) se disolvió en 2-propanol (15 mL), solución de cloruro de hidrógeno 5 M en agua (0,258 mL, 1,292 mmol) y agua (0,25 mL) a 50 °C, luego se agregó paladio, 10% en masa en carbono, 50% agua (0,138 g, 0,065 mmol). Luego se purgó el matraz de reacción con nitrógeno, se unió un globo de hidrógeno y se agitó la mezcla de reacción a 50 °C durante 4 días, el globo de hidrógeno se rellenó

según fuera necesario (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Luego se eliminaron todos los sólidos mediante filtración y la solución resultante se concentró. El residuo se disolvió en 1:1 ACN/agua, se congeló e liofilizó. El polvo resultante (**I-18**) se utilizó sin otra purificación (se supuso un rendimiento cuantitativo). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₂₁N₅O₃ 404,17, hallado 404,2.

**Preparación 5: de ácido
(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (I-19)**

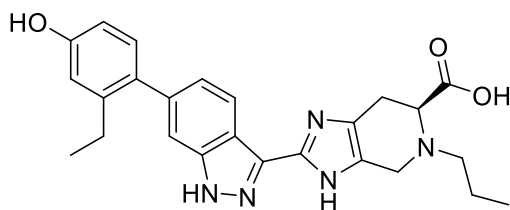


I-19

ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, HCl (**I-18**) (0,25 g, 0,568 mmol) se suspendió en DMF (2,5 mL) y acetona (2,5 mL), luego se agregaron ácido acético (0,098 mL, 1,705 mmol) y cianoborohidruro de sodio (0,179 g, 2,84 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). La mezcla de reacción se concentró, luego el producto crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, 50 g columna acuosa C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (149 mg, 47% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₂₇N₅O₃ 446,21, hallado 446,3.

**Preparación 6: de ácido
(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-propil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (I-20)**

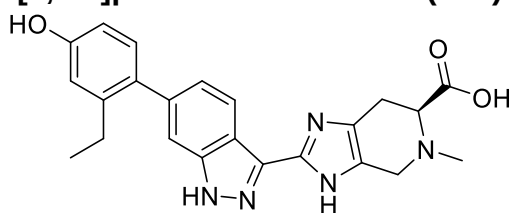
**I-20**

ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, HCl (**I-18**) (0,160 g, 0,364 mmol) y propionaldehído (0,039 mL, 0,546 mmol) se disolvieron en metanol (3,0 mL), luego se agregó cianoborohidruro de sodio (0,069 g, 1,091 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). La mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, 50 g columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (78 mg, 38% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₂₇N₅O₃ 446,21, hallado 446,3.

Preparación**7:****ácido**

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico (I-21)

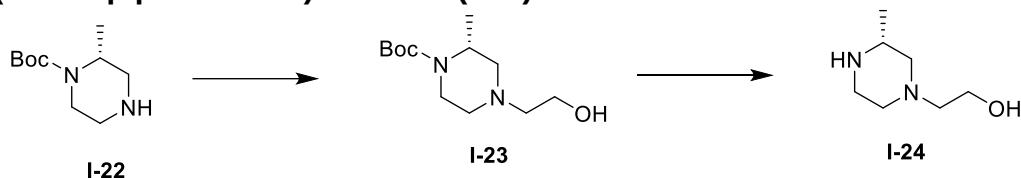
**I-21**

ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, HCl (**I-18**) (0,160 g, 0,364 mmol) y solución de formaldehído, 37% en masa en agua (0,032 mL, 0,436 mmol) se disolvieron en metanol (3,0 mL), luego se agregó cianoborohidruro de sodio (0,069 g, 1,091 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante

4 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó borohidruro de sodio (14 mg, 0,364 mmol) para desactivar un exceso de formaldehído, luego se concentró la mezcla de reacción. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, 50 g columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (110 mg, 57% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₃N₅O₃ 418,18 hallado 418,2.

Preparación 8: dihidrocloruro de (R)-2-(3-metilpiperazin-1-il)etan-1-ol (I-24)



(a) (R)-4-(2-hidroxietyl)-2-metilpiperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo (I-23)

(R)-1-boc-2-metil-piperazina (0,2 g, 0,999 mmol), DIPEA (0,698 mL, 3,99 mmol) y 2-bromoetanol (0,085 mL, 1,198 mmol) se disolvieron en DMF (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 16 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se concentró la mezcla de reacción, luego se agregaron 10 mL de éter dietílico al residuo. Se aplicó ultrasonido a la solución hasta que el gel de residuo había desaparecido y se había formado un sólido. Luego, la solución de éter se decantó separada del sólido. Luego se utilizó el sólido en la siguiente reacción (se supuso un rendimiento cuantitativo). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₂H₂₄N₂O₃ 245,18, hallado 245,4.

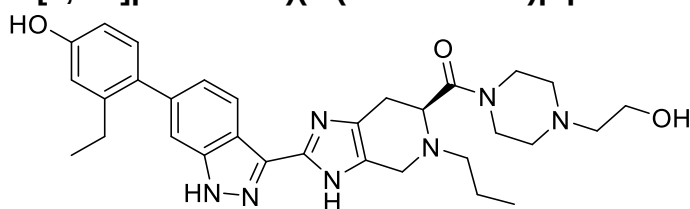
(b) dihidrocloruro de (R)-2-(3-metilpiperazin-1-il)etan-1-ol (I-24)

(R)-4-(2-hidroxietyl)-2-metilpiperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo (0,244 g, 0,999 mmol) se disolvió en dioxano (3,0 mL) y agua (0,5 mL), luego se agregó solución de cloruro de hidrógeno 4 M en dioxano (2,0 mL, 65,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se

monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). La mezcla de reacción se congeló y liofilizó, y el producto resultante se utilizó sin purificación (se supuso un rendimiento cuantitativo). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₇H₁₆N₂O 145,13, hallado 145,4.

Ejemplo 1:

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-propil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metanona



1

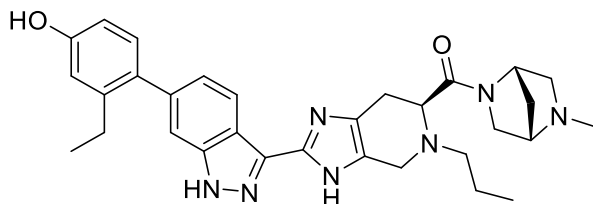
ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-propil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-20**) (40 mg, 0,071 mmol), n-(2-hidroxietil)piperazina (0,018 mL, 0,143 mmol) y DIPEA (0,025 mL, 0,143 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (40,8 mg, 0,107 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,011 mL, 0,357 mmol) para escindir subproductos indeseados, luego se agitó la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (31 mg, 56% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₉N₇O₃ 558,31, hallado 558,3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,10 (s, 1H), 12,27 (d, J = 48,92 Hz, 1H), 9,40 (s, 1H), 8,28 (t, J = 8,10 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,04 (m, 2H), 6,71 (d, J = 2,46 Hz, 1H), 6,64 (dd, J = 2,50, 8,23 Hz, 1H), 4,44 (t, J = 5,31 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 5,26, 2H), 3,96 (m, 1H), 3,86-3,52 (m, 6H), 3,49 (q, J = 6,01 Hz,

2H), 2,95 (m, 2H), 2,48 (q, J = 7,48 Hz, 2H), 2,42-2,21 (m, 4H), 2,37 (t, J = 6,20 Hz, 2H), 1,42 (m, 2H), 1,00 (t, J = 7,52 Hz, 3H), 0,81 (m, 3H).

Ejemplo 2:

((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-propil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)((1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il)metanona



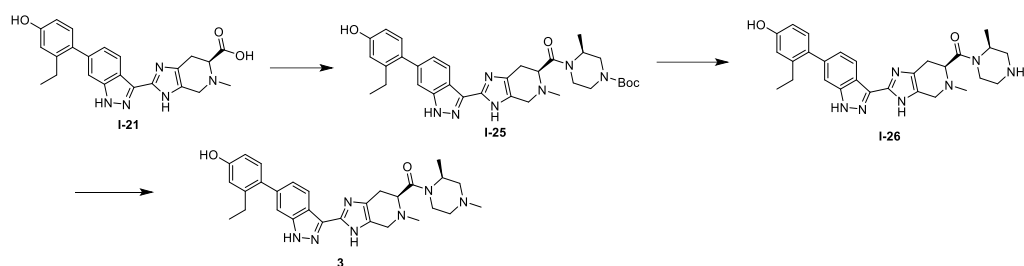
2

ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-propil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-20**) (40 mg, 0,071 mmol), dihidrobromuro de (1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (29,4 mg, 0,107 mmol) y DIPEA (0,062 mL, 0,357 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (40,8 mg, 0,107 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,011 mL, 0,357 mmol) para escindir subproductos indeseados, luego se agitó la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (32 mg, 59% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₇N₇O₂ 540,30, hallado 540,3.

Ejemplo 3:

((S)-2,4-dimetilpiperazin-1-il)((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)metanona



(a) (S)-4-((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carbonil)-3-metilpiperazin-1-carboxilato de *Tert*-butilo (**I-25**)

ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-21**) (55 mg, 0,103 mmol), (S)-4-n-boc-2-metilpiperazina (41,5 mg, 0,207 mmol) y DIPEA (0,036 mL, 0,207 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (59,0 mg, 0,155 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,016 mL, 0,517 mmol) para escindir subproductos indeseados, luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante cromatografía de fase inversa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, 50 g columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (54 mg, 72% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₃H₄₁N₇O₄ 600,33, hallado 600,3.

(b)

((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)((S)-2-metilpiperazin-1-il)metanona (**I-26**)

(S)-4-((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carbonil)-3-metilpiperazin-1-carboxilato de *tert*-butilo, TFA (**I-25**) (0,126 g, 0,177 mmol) se disolvió en dioxano (1,5 mL) y agua (0,3 mL), luego se agregó solución de cloruro de hidrógeno 4 M en dioxano (1,5 mL, 6,00 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente durante 2 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). La mezcla de reacción se congeló y liofilizó y el polvo resultante se utilizó directamente en la siguiente reacción (se supuso un rendimiento cuantitativo). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₈H₃₃N₇O₂ 500,27, hallado 500,3.

(c)

((S)-2,4-dimetilpiperazin-1-il)((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)metanona

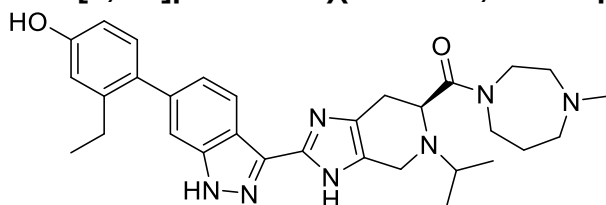
dihidrocloruro

de

((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)((S)-2-metilpiperazin-1-il)metanona (0,101 g, 0,176 mmol) y solución de formaldehído, 37% en masa en agua (0,016 mL, 0,212 mmol) se disolvieron en metanol (3,0 mL), luego se agregó cianoborohidruro de sodio (0,055 g, 0,882 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó borohidruro de sodio (7 mg, 0,176 mmol) para desactivar cualquier formaldehído restante. La mezcla de reacción se concentró, luego, el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 5% a 60% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (28 mg, 21% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₅N₇O₂ 514,29, hallado 514,3.

Ejemplo 4:

((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)(4-metil-1,4-diazepan-1-il)metanona



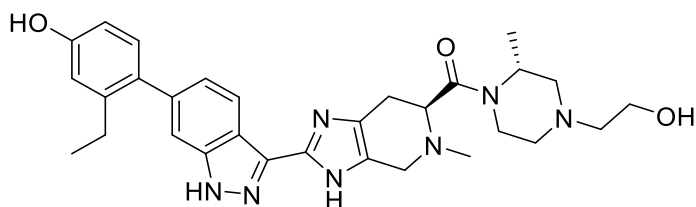
ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-19**) (50 mg, 0,089 mmol), 1-metilhomopiperazina (0,022 mL, 0,179 mmol) y DIPEA (0,031 mL, 0,179 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (51,0 mg, 0,134 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,014 mL, 0,447 mmol) para escindir subproductos indeseados y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 2% a 70% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (29 mg, 42% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₉N₇O₂ 542,32, hallado 542,3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,08 (s, 1H), 12,21 (d, J = 29,9 Hz, 1H), 9,40 (s, 1H), 8,27 (d, J = 8,33 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,04 (t, J = 8,05, 2H), 6,71 (d, J = 2,53 Hz, 1H), 6,64 (dd, J = 2,54, 8,23 Hz, 1H), 4,11 (m, 3H), 3,91-3,52 (m, 6H), 2,97 (m, 1H), 2,91-2,53 (m, 4H), 2,49 (q, J = 7,46, 2H), 2,23 (d, J = 13,9 Hz, 3H), 1,76 (m, 2H), 1,0 (m, 9H).

Ejemplo 5:

((S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)((R)-4-(2-hidroxietil)-2-metilpiperazin-1-il)metanon

a



5

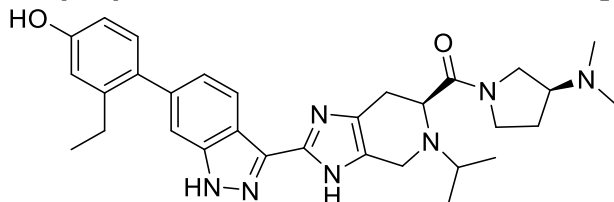
ácido

(S)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-metil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imida

zo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-21**) (55 mg, 0,103 mmol), dihidrocloruro de (*R*)-2-(3-metilpiperazin-1-il)etan-1-ol (**I-24**) (33,7 mg, 0,155 mmol) y DIPEA (0,090 mL, 0,517 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (59,0 mg, 0,155 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,016 mL, 0,517 mmol) para escindir subproductos indeseados, luego se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (22 mg, 28% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₇N₇O₃ 544,30, hallado 544,3.

Ejemplo 6:

((*S*)-3-(dimetilamino)pirrolidin-1-il)((*S*)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)metanona



6

ácido

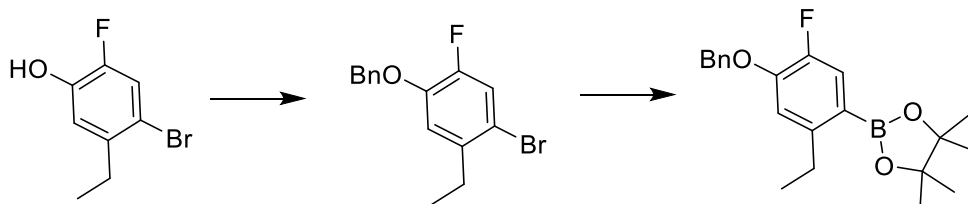
(*S*)-2-(6-(2-etil-4-hidroxifenil)-1H-indazol-3-il)-5-isopropil-4,5,6,7-tetrahidro-3H-imidazo[4,5-c]piridin-6-carboxílico, TFA (**I-19**) (50 mg, 0,089 mmol), (*S*)-(-)-3-(dimetilamino)pirrolidina (0,023 mL, 0,179 mmol) y DIPEA (0,031 mL, 0,179 mmol) se disolvieron en DMF (1,5 mL), luego se agregó HATU (51,0 mg, 0,134 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas (se monitoreó el progreso de la reacción mediante LCMS). Se agregó hidrazina (0,014 mL, 0,447 mmol) para escindir subproductos indeseados y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, la mezcla

de reacción se concentró y el producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente 5% a 70% ACN/agua, columna C18) para proporcionar la sal de TFA del compuesto del título (37 mg, 53% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₉N₇O₂ 542,32, hallado 542,3.

Preparación

9:

2-(4-(Benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano



(a) 1-(Benciloxi)-4-bromo-5-etil-2-fluorobenceno

A una solución de 4-bromo-5-etil-2-fluorofenol (20 g, 91,032 mmol) en ACN (250 mL) se agregó K₂CO₃ (31,55 g, 228,3 mmol) seguido por bromuro de bencilo (13,10 mL, 109,58 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción resultante se agitó a 80 °C durante 2 h. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (tres veces), se combinó y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó a presión reducida para obtener el intermedio del título como un líquido aceitoso amarillo pálido (25 g, 89% rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 7,48 – 7,30 (m, 5H), 7,27 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 2,66 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,16 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

(b)

2-(4-(Benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano

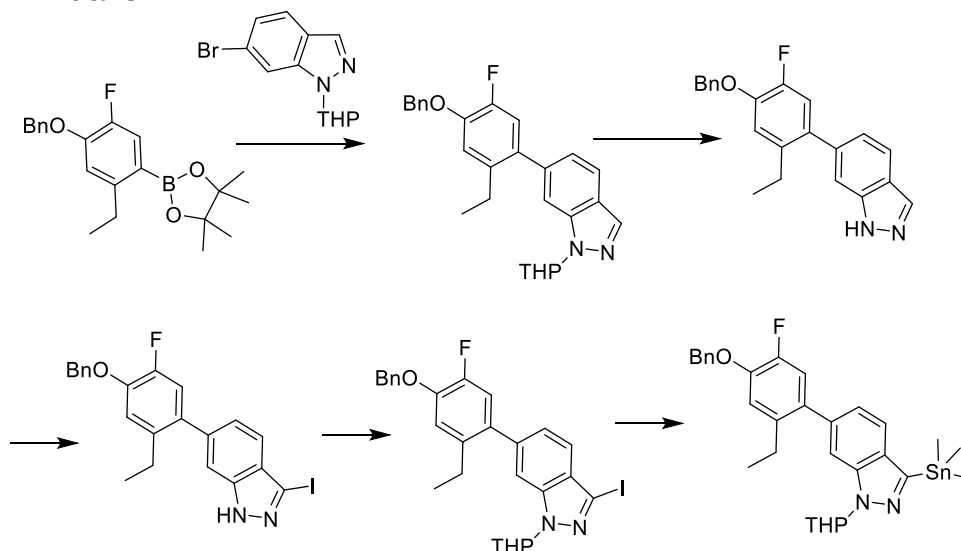
A una solución del producto del paso anterior (12,5 g, 40,45 mmol) en dioxano (100 mL) se agregaron bis(pinacolato)diboron (15,40 g, 60,67 mmol) y KOAc (11,9 g, 121,35 mmol). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 15 min seguido por la adición de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), en un complejo con diclorometano (1,65 g, 2,023 mmol). La mezcla de reacción resultante se agitó

y calentó a 110 °C durante 3 h, se filtró a través de celite y el residuo se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con exceso de EtOAc (200 mL) y se lavó con agua (100 mL) seguido por salmuera (100 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para obtener el producto crudo el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre (100 a 200) gel de sílice, se eluyó con 3% a 5% EtOAc: Hexano para obtener el producto deseado como un sólido blanquecino (9,50 g, 66% rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, Cloroformo- d) δ 7,54 – 7,27 (m, 6H), 6,81 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,16 (s, 2H), 2,84 (q, J = 7,5 Hz, 2H), 1,32 (s, 12H), 1,14 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

Preparación

10:

6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-3-(trimetilstannil)-1H-indazol



(a)

6-(4-(Benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-indazol

A una solución de 6-bromo-1-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (50 g, 178,57 mmol)

y

2-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano

(76,3 g, 214,29 mmol) en DMF:H₂O (480:120 mL) se agregó K₃PO₄ (94,64 g, 446,86 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos, luego se agregó el catalizador Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6,26 g, 8,93 mmol) y

se volvió a degasificar la mezcla con nitrógeno durante 5 minutos de agitación, y se calentó a entre 100 °C y 110 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se lavó el residuo con EtOAc. Se diluyó el filtrado con EtOAc, se lavó con agua fría y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para proporcionar el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna flash para obtener el intermedio del título como un sólido blanco (65 g, 86% rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇FN₂O₂ 431,21 hallado 431,46. ¹H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,06 – 7,98 (m, 2H), 7,70 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,51 – 7,32 (m, 5H), 7,08 (dd, *J* = 809,6, 8,3 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 11,9 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 5,76 – 5,64 (m, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,04 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 3,72 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H), 2,52 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,22 – 2,02 (m, 3H), 1,80 – 1,71 (m, 3H), 1,06 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

(b) 6-(4-(Benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-1*H*-indazol

A una solución del producto del paso anterior (65 g, 151,16 mmol) en metanol (700 mL) se le agregó concentrado de HCl (120 mL) y la solución resultante se calentó a entre 60 °C y 65 °C durante 3 h, se enfrió hasta RT y se concentró al vacío. Se disolvió el residuo en EtOAc y se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y agua. Se secó la capa orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró al vacío para obtener el intermedio del título como un sólido blanco (52 g, 99% (crudo)). ¹H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 8,13 (s, 1H), 7,77 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,59 – 7,30 (m, 6H), 7,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 2,53 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,05 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

(c) 6-(4-(Benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-3-yodo-1*H*-indazol

A una solución de 6-(4-(benciloxi)-2-etil-5-fluorofenil)-1*H*-indazol (56 g, 161,18 mmol) en DMF (400 mL) se agregó KOH (36,2 g, 647,39 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 min. Se agregó lentamente una solución de yodo (82,2 g, 323,69 mmol) en DMF (100 mL) a 0 °C y se agitó a RT durante 30 min,

se diluyó con agua (3 × 150 mL) y se extrajo con EtOAc (3 × 200 mL). La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de metabisulfito de sodio (3 × 200 mL) y agua (400 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna flash para obtener el intermedio del título como un semisólido amarronado (64 g, 84% rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ 10,49 (s, 1H), 7,57 – 7,32 (m, 7H), 7,16 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,04 – 6,91 (m, 2H), 5,20 (s, 2H), 2,51 (q, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,04 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

(d)

6- (4- (benciloxi)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 3yodo- 1- (tetrahydro- 2*H*- piran- 2- il)- 1*H*- indazol

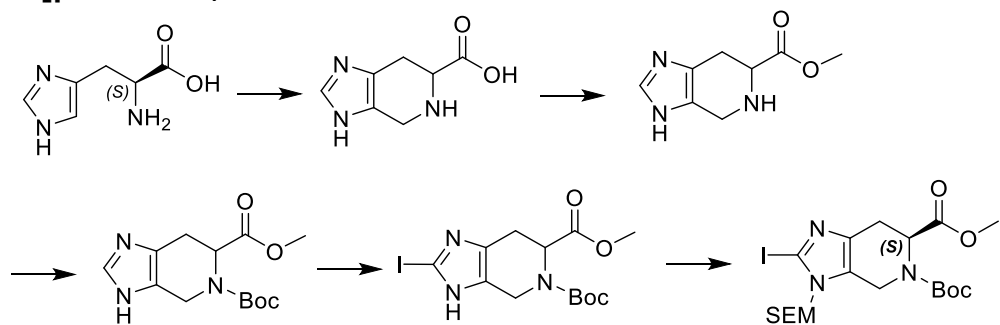
A una solución helada del producto del paso anterior (60 g, 127,12 mmol) en DCM (700 mL) se le añadió ácido *p*- toluensulfónico (4,84 g, 25,423 mmol) seguido de 3,4- dihidro- 2*H*- pirano (17,43 ml, 190,68 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche, se diluyó con DCM y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) para producir el intermedio base como un sólido blanquecino (rendimiento de 64 g, 91%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₆FIN₂O₂ 557,10 hallado 557,30. NMR ¹H (400 MHz, cloroformo- *d*) δ 7,56- 7,31 (m, 7H), 7,14 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 5,68 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,08 - 3,99 (m, 1H), 3,77 - 3,64 (m, 1H), 2,50 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,23 - 1,97 (m, 3H), 1,81 - 1,68 (m, 3H), 1,06 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

(e)

6- (4- (benciloxi)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 1- (tetrahydro- 2*H*- piran- 2- il)- 3- (tri metilestannil)- 1*H*- indazol

A una solución de 6- (4- (benciloxi)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 3- yodo- 1- (tetrahydro- 2*H*- piran- 2- il)- 1*H*- indazol (20 g, 35,97 mmol) en tolueno (150 mL) se añadió hexametilditina (9,2 mL, 43,17 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 20 min seguido de la adición de tetrakis (2,0 g, 1,80 mmol) y luego se agitó a 100 °C durante 2 h, se enfrió a RT, se filtró a través de Celite y el residuo se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en columna (sobre alúmina neutra), eluída con 2- 5%. EtOAc: Hexano para producir el compuesto base (17,50 g, rendimiento del 82%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₅FN₂O₂Sn 595,17, 593,17 encontrado 595,49, 593,55. NMR ¹H (400 MHz, cloroformo- *d*) δ 7,68 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,57 - 7,29 (m, 6H), 7,13 - 7,00 (m, 2H), 6,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,81 - 5,68 (m, 1H), 5,21 (s, 2H), 4,13 - 4,00 (m, 1H), 3,81 - 3,66 (m, 1H), 2,54 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,23 - 2,00 (m, 2H), 1,87 - 1,59 (m, 4H), 1,08 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 0,47 (s, 9H).

Preparación 11: 5- (tert- butil) 6- metil (S)- 2- yodo- 3- ((2- trimetilsilil)etoxi)metil)- 3,4,6,7- tetrahydro- 5*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato



(a) Ácido (S)- 4,5,6,7- tetrahydro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico

A una suspensión agitada de L- histidina (50 g, 322,24 mmol) en agua (420 mL) se le añadió HCl concentrado (29 mL) gota a gota a 0 °C seguido de formaldehído (55 mL, 676,72 mmol) en una porción a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 30 min y luego se calentó a 75 °C durante

6 h y se concentró. El producto bruto resultante se agitó durante 2 h con éter dietílico, se filtró y se lavó con IPA:THF (100:300 ml) para proporcionar la sal HCl del intermedio base como un sólido blanquecino (75 g de rendimiento 99% (bruto)). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_7H_9N_3O_2$ 168,07 hallado 168,17.

(b) (S)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3H- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxilato de metilo

A una solución agitada del producto del paso anterior (75,0 g, 312,5 mmol) en metanol (1500 mL) se le añadió gota a gota $SOCl_2$ (45,6 mL, 625 mmol) a 0 °C y se agitó a RT durante 16 h, luego se calentó hasta reflujo (70 °C) durante 1 h. El disolvente se eliminó por destilación y el producto bruto se trituró con metanol seguido de éter dietílico para proporcionar la sal de HCl bruta del intermedio base como un sólido blanquecino (80 g en bruto). NMR ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9,05 (s, 1H), 4,71 (dd, J = 9,4, 5,2 Hz, 1H), 4,36 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 4,30 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,44 – 3,21 (m, 2H).

(c) 5- (*tert*-butil) 6- metil
(S)- 3,4,6,7- tetrahidro- 5H- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato

A una solución agitada del producto del paso anterior (80,0 g, 314,96 mmol) en metanol (1000 mL) se le añadió DIPEA (282 mL, 1574 mmol) seguido de dicarbonato de di- *tert*- butilo (172 mL, 787,48 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 16 h y luego se añadió NH_3 líquido (150 mL, 25% en agua) y la mezcla de reacción se agitó nuevamente durante 16 h a RT, el metanol se eliminó por destilación y el residuo se extrajo en DCM. (3 $\times$ 200 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentraron y purificaron mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice de malla 100- 200), se eluyeron con MeOH al 5%: DCM para proporcionar el intermedio base (41 g, rendimiento del 46%). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{13}H_{19}N_3O_4$ 282,14 hallado 282,21. NMR ^1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11,85 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 5,18 (dd, J = 49,3, 5,1 Hz, 1H), 4,51 (t,

$J = 14,2$ Hz, 1H), 4,09 (dd, $J = 43,9, 16,1$ Hz, 1H), 3,59 (s, 3H), 3,08 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 2,94 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H), 1,45 (s, 9H).

(d) 5- (*tert*- butil) 6- metil (S)- 2- yodo- 3,4,6,7- tetrahidro- 5*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato

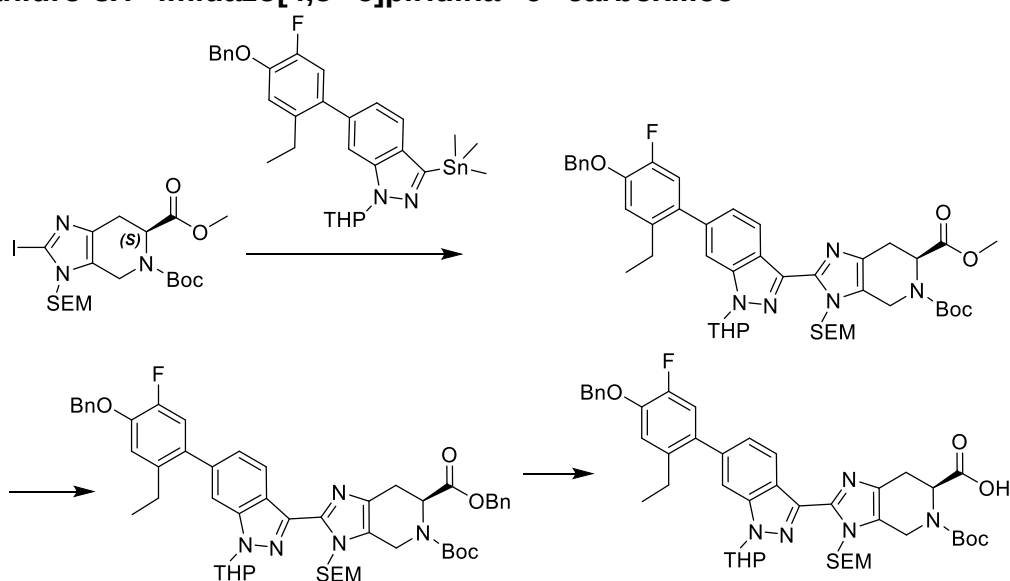
A una solución del producto del paso anterior (41,0 g, 145,9 mmol) en THF (500 mL) se le añadió *N*- yodosuccinimida (66,0 g, 291,8 mmol) a 0 °C y la solución resultante se agitó a RT durante 4 h, diluido con agua y extraído con acetato de etilo. La porción orgánica se lavó con una solución de tiosulfato de sodio al 10% (3 × 200 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar el compuesto base 60 g (en bruto), que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{13}H_{18}IN_3O_4$ 408,03 hallado 408,31. NMR ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,48 (s, 1H), 5,34 - 4,97 (m, 1H), 4,67 - 4,35 (m, 1H), 4,12 - 3,95 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,14 - 2,82 (m, 2H), 1,44 (s, 9H).

(e) 5- (*tert*- butil) 6- metil (S)- 2- yodo- 3- ((2- trimetilsilil)etoxi)metil)- 3,4,6,7- tetrahidro- 5*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato

A una solución agitada de 5- (*tert*-butil) 6- metil (S)- 2- yodo- 3,4,6,7- tetrahidro- 5*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato (40 g, 0,098 mol) en DMF (150 mL) se añadió DIPEA (35,1 mL, 0,19 mol) at 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min y luego se añadió gota a gota cloruro de 2- (trimetilsilil) etoximetilo (19,1 mL, 0,10 mol) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 3 horas a RT. Después de 4 h se añadió agua helada y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (2 × 200 mL). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida, se eluyó con EtOAc: hexano al 20- 35%, para producir el producto base como un líquido viscoso amarillo pálido (27 g). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{19}H_{32}IN_3O_5Si$ 538,12 hallado 538,42. NMR ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,33 - 5,04 (m, 3H), 4,79 -

4,56 (m, 1H), 4,54 - 4,14 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,47 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 3,31 - 3,16 (m, 1H), 2,97 (t, $J = 18,9$ Hz, 1H), 1,44 (s, 9H), 0,92 - 0,74 (m, 2H), -0,03 (s, 9H).

Preparación 12: Ácido (6S)- 5- (tert-butoxicarbonil)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1- (tetrahydro- 2H- piran- 2- il)- 1H- indazol- 3- il)- 3- ((2- (trimetilsilil)etoxi)metil)- 4,5,6,7- tetrahydro-3H- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico



(a) 5- (tert- butil) 6- metil

(6S)- 2- (6- (4- (benziloxy)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 1- (tetrahydro- 2H- piran- 2- il)- 1H- indazol- 3- il)- 3- ((2- (trimetilsilil) etoxi) metil)- 3,4,6,7- tetrahydro- 5H- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato

A una solución agitada de 5- (tert- butil) 6- metil (S)- 2- yodo- 3- ((2- trimetilsilil)etoxi)

metil)- 3,4,6,7- tetrahydro- 5H- imidazo[4,5- c]piridina- 5,6- dicarboxilato

(17,0 g, 31,65 mmol) en tolueno (500 mL) se añadió 6- (4- (benziloxy)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 1- (tetrahydro- 2H- piran- 2- il)- 3- (tri metilstanil)- 1H- indazol (20 g, 34,82 mmol). La mezcla de reacción se purgó con argón durante 15 min, se añadieron $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (3,6 g, 3,16 mmol) y yoduro de cobre (1,20 g, 6,33 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, el filtrado se concentró

a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (columna Redisep 80 g, se eluyó con DCM durante 10 min y luego EtOAc al 15- 20% en hexano para producir el intermedio base como sólido amarillo (15,10 g, rendimiento del 58%). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{46}H_{58}FN_5O_7Si$ 840,41 hallado 840,54. NMR ^1H (400 MHz, cloroformo- d) δ 8,43 (s, 1H), 7,54 - 7,33 (m, 6H), 7,20 (s, 1H), 7,05 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,09 - 5,69 (m, 3H), 5,59 - 5,36 (m, 1H), 5,20 (s, 2H), 4,97 - 4,80 (m, 1H), 4,12 - 3,90 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,57 - 3,47 (m, 2H), 3,40 (d, 1H), 3,21 - 3,05 (m, 1H), 2,74 - 2,34 (m, 4H), 2,25 - 2,07 (m, 2H), 1,94 - 1,65 (m, 4H), 1,54 (s, 9H), 1,12 - 0,99 (m, 3H), 0,91 - 0,75 (m, 2H), -0,12 (s, 9H).

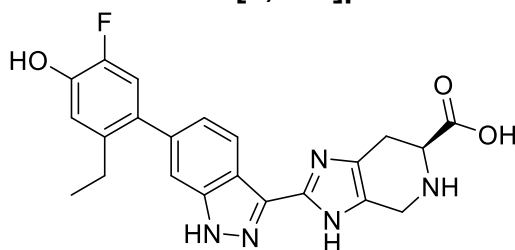
(b) 6- benzil 5- (*tert*- butil)
(6*S*)- 2- (6- (4- (benziloxi)- 2- etil- 5- fluorofenil)- 1- (tetrahidro- 2*H*- piran- 2- il)- 1*H*- indazol- 3- il)- 3- ((2- (trimetilsilil) etoxi)metil)- 3,4,6,7- tetrahidro- 5*H*- imidazo[4,5- *c*]piridina- 5,6- dicarboxilato

A un matraz de fondo redondo se le añadió el producto del paso anterior (15,0 g, 17,85 mmol) en tolueno (400 mL), alcohol bencílico (46,3 mL) y $Ti(OEt)_4$ (7,15 mL, 35,70 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo vigorosamente (140 °C) durante 48 h, se diluyó con agua y se extrajo con DCM. La suspensión se filtró, el filtrado se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (columna Redisep 80 g, EtOAc al 0- 5% en hexano) durante 20 min para eliminar el exceso de alcohol bencílico, luego se eluyó con EtOAc al 10- 15% en hexano) para proporcionar el intermedio base. NMR ^1H coherente con la estructura. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{52}H_{62}FN_5O_7Si$ 916,44 hallado 916,86.

(c) Ácido (6*S*)- 5- (*tert*- butoxicarbonil)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1- (tetrahidro- 2*H*- piran- 2- il)- 1*H*- indazol- 3- il)- 3- ((2- (trimetilsilil)etoxi)metil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- *c*]piridina- 6- carboxílico

A una solución agitada del producto del paso anterior (21,0 g, 22,92 mmol) en 1:1 IPA:THF (400 ml) se le añadió Pd(OH)₂ (5,0 g). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 16 h bajo un globo de hidrógeno, se filtró a través de Celite, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (columna Redisep 80 g, eluída con EtOAc al 25- 40% en hexano) para proporcionar compuesto base (6,1 g, 8,29 mmol) como un sólido blanquecino. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₈H₅₀FN₅O₇Si 736,35 hallado 736,5. NMR ¹H coherente con la estructura. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₈H₅₀FN₅O₇Si 736,35 hallado 736,5. NMR ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,94 (s, 1H), 9,86 (s, 1H), 8,34 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 6,11 - 5,77 (m, 3H), 5,33 - 5,06 (m, 1H), 4,87 - 4,56 (m, 1H), 4,52 - 4,14 (m, 1H), 3,97 - 3,69 (m, 2H), 3,53 - 3,40 (m, 2H), 3,23 - 3,11 (m, 1H), 3,11 - 2,93 (m, 1H), 2,47 - 2,44 (m, 2H), 2,13 - 1,96 (m, 2H), 1,68 (d, *J* = 70,9 Hz, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,02 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 0,86 - 0,68 (m, 2H), -0,17 (s, 9H).

Preparación **13:** **Ácido**
(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico



A una solución agitada de ácido (6*S*)- 5- (*tert*- butoxicarbonil)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1- (tetrahidro- 2*H*- piran- 2- il)- 1*H*- indazol- 3- il)- 3- ((2- (trimetilsilil)etoxi)- metil)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico (5,7 g, 7,75 mmol) en 5:1 dioxano:agua (60 mL) se le añadió HCl (20 mL) concentrado gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó y se agitó a 90 °C durante 16 h y se

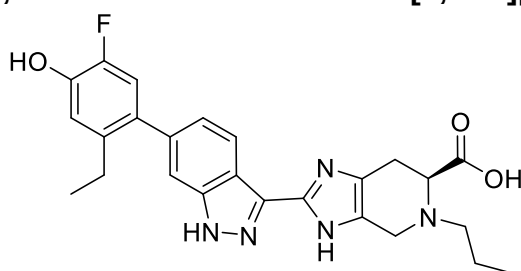
destiló al vacío para proporcionar el residuo crudo, que se trituró secuencialmente con éter dietílico frío y acetonitrilo para proporcionar la sal HCl del compuesto base (3,6 g. 95% de rendimiento) como un sólido marrón claro. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₂₀FN₅O₃ 422,16 hallado 422,24. NMR ¹H (400 MHz, D₂O/DMSO- *d*₆) δ 8,22 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H), 6,99 (d, *J* = 11,9 Hz, 1 H), 6,91 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 4,56 - 4,51 (m, 1H), 4,36 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 4,30 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 3,35 - 3,25 (m, 1H), 3,15 - 3,05 (m, 1H), 2,4 - 2,55 (m, 2H), 0,97 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H).

Preparación

14:

Ácido

(*S*)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- propil - 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- *c*]piridina- 6- carboxílico

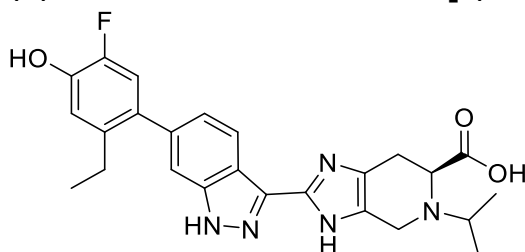


A una solución de ácido

(*S*)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 4,5,6,7- tetra hidro- 3*H*- imidazo[4,5- *c*]piridina- 6- carboxílico HCl (400 mg, 0,874 mmol) y propionaldehído (0,095 mL, 1,310 mmol) en DMF (7 mL), se le añadió cianoborohidruro de sodio (165 mg, 2,62 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió borohidruro de sodio (33 mg, 0,874 mmol), la solución se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (179 mg, 37% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₂₆FN₅O₃ 464,20 hallado 464,5.

Preparación**15:****Ácido**

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico

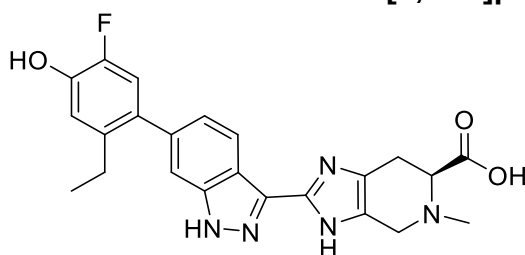


A una solución de ácido

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico HCl (400 mg, 0,874 mmol), acetona (0,192 mL, 2,62 mmol) y ácido acético (0,150 mL, 2,62 mmol) en DMF (7 mL), se le añadió cianoborohidruro de sodio (274 mg, 4,37 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió borohidruro de sodio (33 mg, 0,874 mmol), la solución se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (115 mg, 23% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₂₆FN₅O₃ 464,20 hallado 464,5.

Preparación**16:****Ácido**

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico



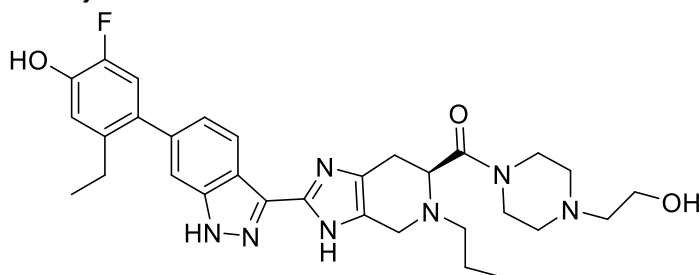
A una solución de ácido

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico, HCl (**8'**) (300 mg, 0,655 mmol) y 37% en peso de formaldehído en agua (0,059 mL, 0,786 mmol) de DMF (5 mL), se le añadió cianoborohidruro de sodio (165 mg, 2,62 mmol) y

la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió borohidruro de sodio (25 mg, 0,655 mmol), la solución se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (columna de 100 g, 5- 75% ACN/agua) para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (85 mg, 24% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₂FN₅O₃ 436,17 hallado 436,45.

Ejemplo 7:

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- propil - 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)(4- (2- hidroxietil)piperazin- 1- il)metanona C- 1

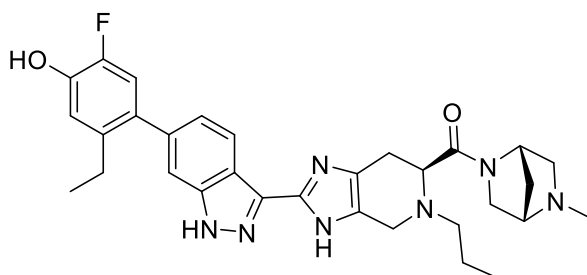


C-1

A una solución de ácido (S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- propil- 4,5, 6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico TFA (30 mg, 0,052 mmol), 2-(piperazin-1-il)etanol, 2HCl (0,19 mL, 0,156 mmol) y DIPEA (0,027 mL, 0,156 mmol) en DMF (1,5 mL), se le añadió HATU (29,6 mg, 0,078 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió Hidrazina (5 eq), la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (15,4 mg, 37% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₈FN₇O₃ 576,30 hallado 576,2.

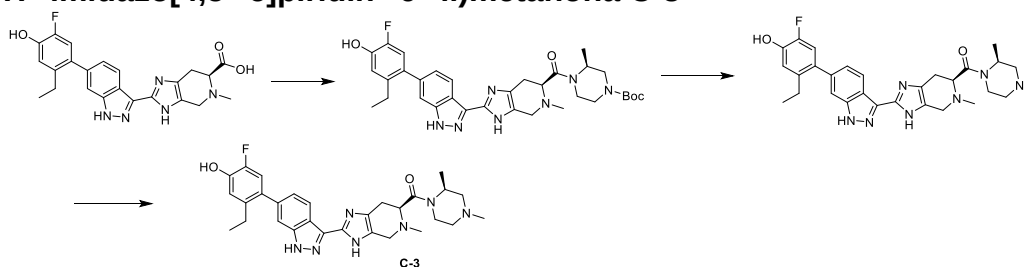
Ejemplo 8:

((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- propil - 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)((1*S*,4*S*)- 5- metil- 2,5 - diazabicyclo- [2.2.1]heptan- 2- il)metanona C- 2

**C-2**

A una solución de ácido (S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- propil- 4,5, 6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico TFA (30 mg, 0,052 mmol), (1*S*,4*S*)- 5- metil- 2,5- diazabicyclo[2.2.1]heptano dihidrobromuro (42,7 mg, 0,156 mmol) y DIPEA (0,064 mL, 0,364 mmol) en DMF (1,5 mL), se le añadió HATU (29,6 mg, 0,078 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió Hidrazina (5 eq), la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (27 mg, 66% de rendimiento). (*m/z*): [*M*+*H*]⁺ calculado para C₃₁H₃₆FN₇O₂ 558,29 hallado 558,3. NMR ¹H (400 MHz, Metanol- *d*₄) δ 8,17 (dt, 1H), 7,59 - 7,50 (m, 1H), 7,32 (dd, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,90 (d, 1H), 5,03 - 4,91 (m, 2H), 4,56 - 4,34 (m, 2H), 4,30 - 3,88 (m, 4H), 3,76 - 3,55 (m, 1H), 3,28 - 3,10 (m, 1H), 3,10 - 2,96 (m, 4H), 2,81 - 2,62 (m, 2H), 2,53 (q, 2H), 2,47 - 2,33 (m, 1H), 2,31 - 2,14 (m, 1H), 1,79 - 1,57 (m, 2H), 1,07 (t, 3H), 0,97 (td, 3H).

Ejemplo 9: ((*S*)- 2,4- dimetilpiperazin-1-il)((*S*)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)metanona C-3



(a) *Tert*- butil

(S)- 4- ((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahydro- 3H- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carbonil)- 3- metilpiperazina- 1- carboxilato

Ácido

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahydro- 3H- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico (0,120 g, 0,276 mmol), (S)- 4- n- boc- 2- metilpiperazina (0,110 g, 0,551 mmol) y DIPEA (0,096 mL, 0,551 mmol) se disolvieron en DMF (3,0 mL), luego se añadió HATU (0,157 g, 0,413 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas (el progreso de la reacción se controló mediante LCMS). Se añadió hidrazina (0,043 mL, 1,378 mmol) para escindir los subproductos no deseados, luego la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, la mezcla de reacción se concentró y el producto bruto se purificó mediante cromatografía de fase inversa (gradiente de ACN/agua al 5- 70%, columna C18 de 50 g) para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (126 mg, rendimiento del 62%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₃H₄₀FN₇O₄ 618,32 hallado 618,3.

(b)

((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahydro- 3H- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)((S)- 2- metilpiperazin- 1- il)metanona

Tert- butil

(S)- 4- ((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahydro- 3H- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carbonil)- 3- metilpiperazina- 1- carboxilato, TFA (0,126 g, 0,172 mmol) se disolvió en dioxano (1,5 mL) y agua (0,3 mL), luego se añadió ácido clorhídrico, 4 M en dioxano (1,5 mL, 49,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora (el progreso de la reacción se controló mediante LCMS) La

mezcla de reacción se congeló y liofilizó y el polvo resultante se usó directamente en la siguiente reacción (se supuso un rendimiento cuantitativo).

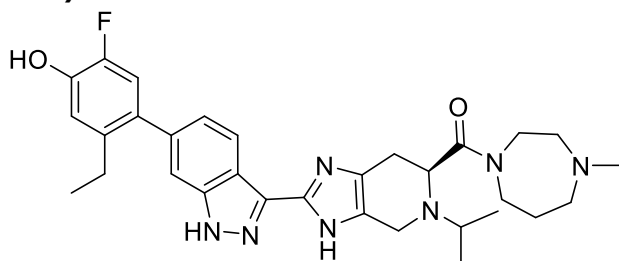
(m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₈H₃₂FN₇O₂ 518,26 hallado 518,3.

(c) ((S)- 2,4- dimetilpiperazin-1-il)((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro - 3H- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)metanona

((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3H- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)((S)- 2- metilpiperazin- 1- il)metanona, diclorhidrato (0,102 g, 0,173 mmol) y solución de formaldehído, 37% en peso en agua (0,015 mL, 0,207 mmol) se disolvieron en metanol (3,0 mL), luego cianoborohidruro de sodio (0,054 g, 0,864 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas (el progreso de la reacción se controló mediante LCMS). Se añadió borohidruro de sodio (7 mg, 0,173 mmol) para apagar cualquier formaldehído restante. La mezcla de reacción se concentró, luego el producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa (gradiente de ACN/agua al 5- 60%, columna C18) para proporcionar el compuesto base como la sal de TFA (59 mg, 45% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₄FN₇O₂ 532,28 hallado 532,3.

Ejemplo 10:

(S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1H- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3H- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)(4- metil- 1,4- diazepan- 1- il)metanona C- 4

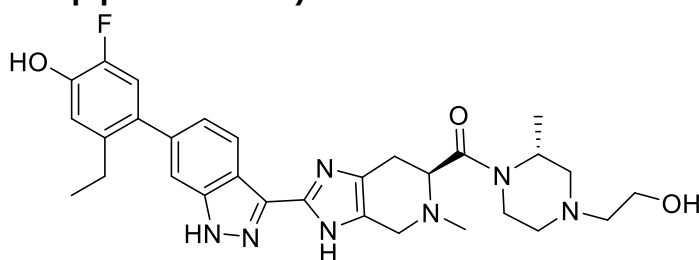


C-4

A una solución de ácido (S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico, TFA (30 mg, 0,052 mmol), 1- metilhomopiperazina (0,019 mL, 0,156 mmol) y DIPEA (0,036 mL, 0,208 mmol) en DMF (1 mL), se añadió HATU (29,6 mg, 0,078 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. Se añadió hidrazina (5 eq), la mezcla de reacción se agitó a RT durante 10 min, se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (26,9 mg, 66% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₁H₃₈FN₇O₂ 560,31 hallado 560,2.

Ejemplo 11:

((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridin- 6- il)((R)- 4- (2- hidroxietil) - 2- metil- piperazin- 1- il)metanona C- 5

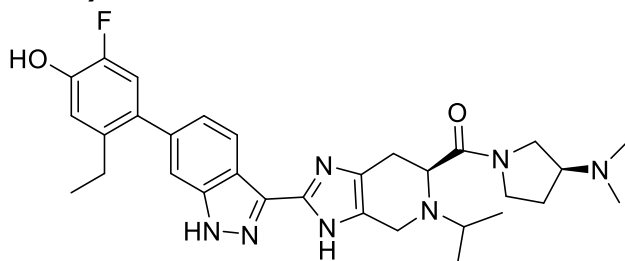


C-5

A una solución de ácido (S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- metil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico TFA (30 mg, 0,052 mmol), (R)- 2- (3- metilpiperazin-1-il)etanol, 2 HCl (35,6 mg, 0,164 mmol) y DIPEA (0,057 mL, 0,328 mmol) en DMF (1 mL), se le añadió HATU (31,1 mg, 0,082 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió Hidrazina (8,57 µL, 0,273 mmol), la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (15,6 mg, 36% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₆FN₇O₃ 562,29 hallado 562,2.

Ejemplo 12:

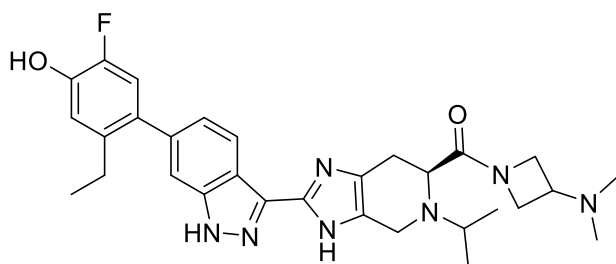
((S)- 3- (dimetilamino)pirrolidin- 1- il)((S)- 5- etil- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c] piridin- 6- il)metanona C-6

**C-6**

A una solución de ácido ((S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico TFA (179 mg, 0,310 mmol), (S)- *N,N*- dimetilpirrolidin- 3- amina (0,079 mL, 0,620 mmol) y DIPEA (0,162 mL, 0,930 mmol) en DMF (4 mL), se le añadió HATU (177 mg, 0,465 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió Hidrazina (5 eq), la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (107 mg, 44% de rendimiento). (*m/z*): [*M*+*H*]⁺ calculado para C₃₁H₃₈FN₇O₂ 560,31 hallado 560,2. NMR ¹H (400 MHz, Metanol- *d*₄) δ 8,21 (d, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,26 (d, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,90 (d, 1H), 4,83 - 4,66 (m, 1H), 4,48 - 4,25 (m, 2H), 4,23 - 4,12 (m, 1H), 4,12 - 3,93 (m, 2H), 3,93 - 3,63 (m, 3H), 3,62 - 3,48 (m, 1H), 3,26 - 3,09 (m, 1H), 2,98 (d, 6H), 2,67 - 2,57 (m, 1H), 2,53 (q, 2H), 2,44 - 2,12 (m, 1H), 1,41 (t, 3H), 1,31 (d, 3H), 1,05 (t, 3H).

Ejemplo 13:

((S)- (3- (dimetilamino)azetidin- 1- il)(2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c] piridin- 6- il)metanona D-1

**D-1**

A una solución de ácido (S)- 2- (6- (2- etil- 5- fluoro- 4- hidroxifenil)- 1*H*- indazol- 3- il)- 5- isopropil- 4,5,6,7- tetrahidro- 3*H*- imidazo[4,5- c]piridina- 6- carboxílico TFA (179 mg, 0,310 mmol), *N,N*- dimetilazetidín- 3- amina, 2 HCl (107 mg, 0,465 mmol) y DIPEA (0,162 mL, 0,930 mmol) en DMF (4 mL), se le añadió HATU (177 mg, 0,465 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante la noche. Se añadió Hidrazina (5 eq), la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la sal de TFA del compuesto base (63 mg, 26% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₆FN₇O₂ 546,29 hallado 546,7. NMR ¹H (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ- 9,90 (s, 1H), 8,29 (dd, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,07 (d, 1H), 7,01 (d, 1H), 6,89 (d, 1H), 4,35 – 4,18 (m, 1H), 4,11 – 3,94 (m, 1H), 3,94 – 3,73 (m, 3H), 3,70 – 3,57 (m, 2H), 3,06 – 2,94 (m, 2H), 2,87 – 2,66 (m, 2H), 2,48 – 2,40 (m, 2H), 2,13 – 2,00 (m, 6H), 1,07 (t, 3H), 1,03 – 0,93 (m, 6H).

Ensayos Biológicos

Los compuestos de la invención se han caracterizado en uno o más de los siguientes ensayos biológicos.

Ensayo 1: Ensayos Bioquímicos de JAK Cinasa

Se realizó un panel de cuatro ensayos bioquímicos de LanthaScreen JAK (JAK1, 2, 3 y Tyk2) en un tampón de reacción de cinasa común (50 mM HEPES, pH 7,5, Brij-35 al 0,01%, 10 mM mgCl₂ y 1 mM de EGTA). Las enzimas JAK etiquetadas con GST recombinante y un sustrato peptídico STAT1 etiquetado con GFP se obtuvieron de Life Technologies.

Los compuestos diluidos en serie se preincubaron con cada una de las cuatro enzimas JAK y el sustrato en microplacas blancas de 384 pocillos (Corning) a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se agregó ATP para iniciar las reacciones de la cinasa en un volumen total de 10 μ L, con DMSO al 1%. Las concentraciones enzimáticas finales para JAK1, 2, 3 y Tyk2 son 4,2 nM, 0,1 nM, 1 nM y 0,25 nM respectivamente; las concentraciones correspondientes de K_m ATP utilizadas son de 25 μ M, 3 μ M, 1,6 μ M y 10 μ M; mientras que la concentración de sustrato es de 200 nM para los cuatro ensayos. Se permitió que las reacciones de la cinasa continuaran durante 1 hora a temperatura ambiente antes de agregar una preparación de 10 μ L de EDTA (concentración final de 10 mM) y anticuerpo Tb-anti-pSTAT1 (pTyr701) (Life Technologies, concentración final de 2 nM) en tampón de dilución TR-FRET (Life Technologies). Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de leerlas en el lector EnVision (Perkin Elmer). Las señales de relación de emisión (520 nM/495 nM) se registraron y utilizaron para calcular los valores de porcentaje de inhibición según DMSO y controles de fondo.

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

Los compuestos de prueba que tienen un valor de K_i más bajo o un valor de pK_i más alto en cada uno de los cuatro ensayos de JAK muestran una mayor inhibición de la actividad de JAK.

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

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

El STAT5 fosforilado se midió con el kit AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5 (Tyr694/699) (PerkinElmer).

Las células T humanas de la línea celular Tall-1 se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en rpmI (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 15% (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) y 1X Pen/Strep (Life Technologies). Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y se dispensaron acústicamente en pocillos vacíos. Se dispensaron medios de ensayo (DMEM sin rojo de fenol (Life Technologies) complementados con FBS al 10% (ATCC) (4 µL/pocillo) y las placas se agitaron a 900 rpm durante 10 minutos. Las células se sembraron a 45.000 células/pocillo en medio de ensayo (4 µL/pocillo) y se incubaron a 37 °C, de CO₂ al 5% durante 1 hora y luego se agregó IL-2 (R&D Systems; concentración final de 300 ng/mL) en medios de ensayo precalentados (4 µL) durante 30 minutos. Después de la estimulación con citocinas, las células se lisaron con 6 µL de 3x de tampón de lisis AlphaLisa (PerkinElmer) que contenía 1x PhosStop y comprimidos Complete (Roche). El lisado se agitó a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT). El STAT5 fosforilado se midió con el kit pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). La mezcla de perlasceptoras recién preparada se dispensó sobre lisado (5 µL) bajo luz verde filtrada <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se centrifugaron brevemente y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se dispensaron perlas de donantes (5 µL) bajo luz verde filtrada <100 lux. Las placas se agitaron a 900 rpm durante 2 minutos, se

centrifugaron brevemente y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se midió con una excitación de 689 nM y una emisión de 570 nM usando un lector de placa EnVision (PerkinElmer) bajo una luz verde filtrada <100 lux.

Para determinar la potencia inhibitoria de los compuestos de prueba en respuesta a IL-2, se midió la intensidad de emisión promedio de las perlas unidas a pSTAT5 en una línea de células T humanas. Los valores de CI_{50} se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de la intensidad de la señal frente a la concentración del compuesto. Los datos se expresan como valores pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}) (media $\pm$ desviación típica).

Resultados del Ensayo *In Vitro*

Tabla 1

Número de ejemplo	J AK1 p K _i	J AK2 p K _i	J AK3 pK _i	T yk2 pK _i	Tall- 1 pIC ₅₀
1	1 0,2	1 0,3	9, 8	9, 0	8,8
C-1	1 0,2	1 0,5	9, 7	9, 1	8,7
2	1 0,3	1 0,2	9, 8	8, 9	8,4
C-2	1 0,3	1 0,8	9, 9	9, 5	8,6
3	1 0,2	1 0,4	1 0,2	9, 3	8,8
C-3	1 0,2	1 0,5	9, 7	9, 3	8,7

4	1 0,1	1 0,4	1 0,1	9, 0	8,6
C-4	1 0,0	1 0,6	9, 8	9, 3	8,7
5	1 0,3	1 0,5	1 0,1	9, 2	8,8
C-5	1 0,1	1 0,7	9, 9	9, 5	8,6
6	1 0,2	1 0,4	1 0,0	9, 0	8,7
C-6	1 0,2	1 0,7	9, 8	9, 3	8,6

Ensayo 3: Modelo murino (ratón) de inducción de pSTAT6 inducida por IL-13 en tejido pulmonar.

La IL- 13 es una citocina importante que subyace a la fisiopatología del asma (Kudlacz *et al. Eur. J. Pharmacol*, **2008**, 582,154- 161). La IL-13 se une a los receptores de la superficie celular que activan a los miembros de la familia de cinasas de Jano (JAK), que luego fosforilan a STAT6 y posteriormente activan otras vías de transcripción. En el modelo descrito, se administró una dosis de IL- 13 de forma local a los pulmones de ratones para inducir la fosforilación de STAT6 (pSTAT6) que luego se mide como criterio de valoración.

Se usaron ratones adultos Balb/c de Harlan en el ensayo. El día del estudio, los animales se anestesiaron ligeramente con isoflurano y se les administró vehículo o compuesto de prueba (1 mg/mL, 50 µL de volumen total durante varias respiraciones) mediante aspiración oral. Los animales se colocaron en decúbito lateral después de la dosis y se monitorizó la

recuperación completa de la anestesia antes de ser devueltos a su jaula de origen. Cuatro horas más tarde, los animales se anestesiaron una vez más brevemente y fueron expuestos al vehículo o a IL- 13 (dosis total liberada de 0,03 µg, volumen total de 50 µL) mediante aspiración oral antes de controlar la recuperación de la anestesia y regresarlos a su jaula de casa. Una hora después de la administración del vehículo o de IL- 13, se recolectaron sangre total y pulmones para la detección de pSTAT6 en homogeneizados de pulmón usando un equipo de ensayo Perkin Elmer AlphaLISA® *SureFire® Ultra™ HV* p- STAT6 (Tyr641) y para el análisis de concentración total de fármaco en pulmón y plasma. Las muestras de sangre se centrifugaron (centrífuga Eppendorf, 5804R) durante 4 minutos a aproximadamente 12.000 rpm a 4 °C para recoger el plasma. Los pulmones se aclararon en DPBS (solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco), se secaron con almohadillas, se congelaron rápidamente, se pesaron y homogeneizaron a una dilución de 1:3 en ácido fórmico al 0,1% en agua de HPLC. Las concentraciones en plasma y pulmón del compuesto de prueba se determinaron mediante análisis LC-MS frente a estándares analíticos contruidos en una curva estándar en la matriz de prueba. Se determinó la relación pulmón a plasma como la relación entre la concentración pulmonar en ng/g y la concentración plasmática en ng/mL a las 5 horas.

La actividad en el modelo se evidencia por una disminución en la concentración de pSTAT6 presente en los pulmones de los animales tratados a las 5 horas en comparación con los animales de control expuestos a IL- 13 tratados con vehículo. La diferencia entre los animales de control que fueron tratados con vehículo, expuestos a IL- 13 y los animales de control que fueron tratados con vehículo, expuestos al vehículo dictó el 0% y 100% de efecto inhibitor, respectivamente, en cualquier experimento dado. Los compuestos probados en el ensayo exhibieron inhibición de la fosforilación de STAT6 5 horas después de la exposición a IL- 13 como se documenta a continuación.

Tabla 2: Inhibición de pSTAT6 y exposición plasmática/pulmonar observada

Compuesto	Concentración pulmonar (ng/g) a las 5 h	Concentración en plasma (ng/mL) a las 5 h	Relación pulmón a plasma a las 5 h	Inhibición de pSTAT6 a las 5 horas
1	13000±5 720	10,3±3,9	126 2	67
2	23450±1 2528	17,5±25	134 0	72
3	6330±11 31	15,4±7	411	76
4	17350±6 625	22,0±23	788	67
5	5445±18 62	13,0±3,7	418	73
6	11600±4 682	11,3±5,7	102 6	37

La observación de una concentración significativa en los compuestos ensayados en el pulmón de ratón confirmó que la inhibición observada de la inducción de pSTAT6 inducida por IL- 13 era el resultado de la actividad del compuesto de ensayo. La relación pulmón a plasma a las 5 horas mostró que los compuestos 1 a 6 exhibían significativamente más exposición en el pulmón que la exposición en plasma en ratones.

Ensayo 4: Inhibición de la liberación de TARC evocada por TSLP en células mononucleares de sangre periférica humana

La linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) y el timo y la quimiocina regulada por activación (TARC) se sobreexpresan en las vías respiratorias asmáticas y se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. En los pulmones, las células epiteliales bronquiales pueden liberar TSLP en respuesta a alérgenos e infecciones virales. TSLP envía señales a través de un heterodímero de IL-7R α /TSLPR que se encuentra en una amplia gama de tejidos y tipos de células, incluidas células epiteliales, células endoteliales, neutrófilos, macrófagos y mastocitos. La unión del TSLP a su receptor induce un cambio conformacional que activa JAK1 y JAK2 para fosforilar varios factores de transcripción, incluidos STAT3 y STAT5. En las células inmunitarias, esto desencadena una cascada de eventos intracelulares que dan lugar a la proliferación celular, la antiapoptosis, la migración de células dendríticas y la producción de citocinas y quimiocinas Th2. En las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), el TSLP tiene un efecto proinflamatorio al activar las células dendríticas mieloides para atraer y estimular las células T, un proceso mediado por el quimioatrayente TARC.

En este ensayo se demostró que la estimulación del TSLP induce la liberación de TARC de los PBMC y que esta respuesta se atenúa en función de la dosis del tratamiento con el compuesto. Se midieron las potencias de los compuestos de prueba para determinar la inhibición de la liberación de TARC.

Se descongelaron porciones de PBMC (anteriormente aisladas de sangre completa y congeladas en porciones a -80 °C) de 3 a 5 donantes a 37 °C y se agregaron gota a gota a 40 mL de medio RPMI completo precalentado y filtrado de forma estéril en Tubos Falcon de 50 mL. Las células se sedimentaron y resuspendieron en medio completo a $2,24 \times 10^6$ células/mL. Las células se sembraron a 85 μ L (190.000 células) por pocillo en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos tratada con cultivo de tejidos. Las células se dejaron reposar durante 1 hora a 37 °C con 5% CO₂.

Los compuestos se recibieron como soluciones de partida de 10 mM en DMSO. Se realizaron diluciones en serie de 3,7 veces para generar 9 concentraciones de compuesto de prueba en DMSO a 300 veces la concentración de prueba de ensayo final. Se realizaron diluciones intermedias de 150 veces en medio completo para generar el compuesto a 2X de la concentración de prueba del ensayo final con DMSO al 0,2%. Después del período de descanso de 1 hora, se añadieron 95 μ L de compuesto 2X a cada pocillo de PBMC, para un intervalo de concentración de ensayo final de 33,33 μ M a 0,95 μ M. Se añadieron 95 μ L de DMSO al 0,2% en medio completo a los pocillos de control sin tratar. Las células se pretrataron con compuesto durante 1 hora a 37 °C con 5% de CO₂ antes de la estimulación.

La proteína TSLP humana recombinante se reconstituyó a 10 μ g/mL en DPBS estéril con BSA al 0,1% y se almacenó en porciones a -20 °C. Inmediatamente antes de su uso, se descongeló una porción y se preparó la concentración final del ensayo a 20X en medio completo. Se agregaron 10 μ L de TSLP 20X a cada pocillo de PBMC, para una concentración de ensayo final de 10 ng/mL. Se agregaron 10 μ L de medio completo a los pocillos de control no estimulados. Las células se estimularon en presencia de compuesto durante 48 horas a 37 °C con 5% CO₂.

Después de la estimulación, se recolectaron los sobrenadantes del cultivo celular y se detectaron los niveles de TARC mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), utilizando el equipo ELISA Human CCL17/TARC Quantikine (R&D Systems #DDN00) según las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se representó el log (compuesto de prueba [M]) frente a los valores de respuesta porcentual para cada donante y los valores de IC₅₀ se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal con el Software GraphPad Prism utilizando el algoritmo de respuesta a dosis sigmoidea de 4 parámetros con pendiente variable. Los datos se

expresan como valores medios de pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}) calculados a partir de los valores de pIC_{50} de donantes individuales y redondeados a un decimal. Los valores de potencia para la inhibición por compuestos originales y sus análogos modificados con fluoro se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores de potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la liberación de TARC evocada por TSLP en células mononucleares de sangre periférica humana

Compuesto	$pIC_{50} \pm \text{st. dev.}$
1	$7,1 \pm 0,1$
C-1	$7,0 \pm 0,3$
2	$6,8 \pm 0,2$
C-2	$6,6 \pm 0,2$
3	$7,3 \pm 0,2$
C-3	$7,0 \pm 0,1$
4	$6,8 \pm 0,1$
C-4	$7,0 \pm 0,4$
5	$7,5 \pm 0,6$
C-5	$7,3 \pm 0,1$
6	$6,8 \pm 0,2$
C-6	$6,8 \pm 0,2$

Ensayo 5: Metabolismo del pulmón S9

Se evaluó la estabilidad metabólica *in vitro* de los compuestos 1- 6 y C- 1 a C- 6 en la fracción S9 de pulmón humano (compuesto 1 μM ; proteína S9 1 mg/mL). Las muestras de tiempo 0, 15, 30 y 60 minutos se analizaron para el compuesto original mediante LC- MS/MS de alta resolución. Las fracciones de pulmón S9 de ser humano (lote 1410245) se adquirieron de

XenoTech LLC (Lenexa, KS). NADPH (Sigma Aldrich, N1630) y 5- fosfosulfato de 3-fosfoadenosina (PAPS) (Sigma Aldrich, A1651) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El acetonitrilo y el agua se obtuvieron de VWR (Radnor, PA) y eran de calidad HPLC o mejor. El raloxifeno y el ácido fórmico se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Las incubaciones de pulmón S9 se realizaron en un baño de agua a 37 °C en una placa de polipropileno de 96 pocillos. Las soluciones de pulmón S9 consistieron en fosfato de potasio 100 mM tamponado a un pH de 7,4 (BD Biosciences, Woburn, MA) suplementado con NADPH 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), cloruro de magnesio 3 mM (Sigma Aldrich, M1028) y en la presencia de cofactor de PAPS 100 μ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), con concentraciones de proteína de incubación final de 1 mg/mL. Se diluyeron reservas de DMSO 10 mM de raloxifeno (n=1) y compuesto (n=1) en tampón y se añadieron a las incubaciones para producir concentraciones de sustrato de 1 μ M (DMSO al 0,001% v/v). Los volúmenes de incubación consistieron en 400 μ L y los puntos temporales se tomaron a los 0, 15, 30 y 60 minutos mediante la eliminación de una porción de 70 μ L y la dilución en 140 μ L de acetonitrilo (ácido fórmico al 0%). Todas las muestras se centrifugaron a 2250 g durante 10 minutos a 5 °C. Se tomó el sobrenadante (50 μ L) de las muestras centrifugadas y se diluyó en 100 μ L de agua de HPLC que contenía el patrón interno. Las muestras se procesaron en un muestreador automático Dionex Ultimate 3000 y se analizaron con un espectrómetro de masas de alta resolución Thermo Q- Exactive (Thermo, Waltham, MA) en modo de escaneo completo junto con una columna Atlantis T3 de 3 μ M - 2,1 $\times$ 50 mm (Waters Inc., 186003717). La fase móvil A consistió en agua+ácido fórmico al 0,2% y la fase móvil B consistió en acetonitrilo+ácido fórmico al 0,2%. La integración máxima se logró utilizando el software Gubbs GMSU (Gubbs Inc., Alpharetta, GA). Para cada muestra, se calcularon las relaciones del área de los picos dividiendo el área del pico del analito por el área del pico del patrón interno. Para cada incubación, las

proporciones de las áreas de los picos de los analitos en cada t₀ se establecieron en 100% y las proporciones de las áreas de los picos de las muestras de 60 minutos se convirtieron en porcentajes restantes con respecto al t₀ correspondiente. La determinación de la formación del metabolito sulfato se realizó cualitativamente mediante la observación del pico de elución temprana en el canal iónico original que, según los datos internos históricos, correspondía al metabolito O- sulfato de cada compuesto original. Los resultados del ensayo se resumen en la Tabla 4 (n=2 réplicas).

Tabla 4: Estabilidad metabólica en la fracción S9 del pulmón humano

Com puesto	Aclaramie nto (µL/min/mg)	Compuesto restante a los 60 min (%)	Apariencia del sulfato
1	4,2	78	Sí
C-1	20,8	29	Sí
2	3,5	81	Sí
C-2	61,0	3	Sí
3	2,6	86	Sí
C-3	33,2	14	Sí
4	2,1	88	Sí
C-4	53,4	4	Sí
5	3,7	80	Sí
C-5	42,2	8	Sí
6	3,4	82	Sí
C-6	51,4	5	Sí

Cuando se comparan con sus correspondientes análogos fluorados (compuestos **C- 1** a **C- 6**), los compuestos **1** a **6** dan lugar a un metabolismo de sulfatación significativamente menor en la Fracción S9 del pulmón.

Ensayo 6: Farmacocinética en plasma y pulmón en ratón

Se determinaron las concentraciones en plasma y pulmón de los compuestos de prueba y sus proporciones de la siguiente manera. En el ensayo se utilizaron ratones BALB/c de Charles River Laboratories. Los compuestos de prueba se formularon individualmente en propilenglicol al 20% en amortiguador de citrato de pH 4 a una concentración de 0,2 mg/mL y se introdujeron 50 µL de la solución de dosificación en la tráquea de un ratón mediante aspiración oral. En varios puntos temporales (típicamente 0,167, 2, 6, 24 h) después de la dosificación, se retiraron muestras de sangre mediante punción cardíaca y se extirparon los pulmones intactos de los ratones. Las muestras de sangre se centrifugaron (centrífuga Eppendorf, 5804R) durante 4 minutos a aproximadamente 12.000 rpm a 4 °C para recoger el plasma. Los pulmones se secaron con almohadillas, se pesaron y homogeneizaron a una dilución de 1:3 en agua estéril. Las concentraciones en plasma y pulmón del compuesto de prueba se determinaron mediante análisis LC-MS frente a estándares analíticos contruidos en una curva estándar en la matriz de prueba. Se determinó la relación pulmón a plasma como la relación entre el AUC pulmonar en µg h/g y el AUC plasmático en µg h/mL, donde el AUC se define convencionalmente como el área bajo la curva de concentración del compuesto de prueba frente al tiempo.

Tabla 5: Exposición del tejido pulmonar y del plasma después de la administración por aspiración oral única de los compuestos de prueba

Compuesto	AUC ₍₀₋₂₄₎ en plasma (µg h/mL)	Tejido pulmonar AUC ₍₀₋₂₄₎ (µg h/g)	Tejido pulmonar: relación AUC plasmática
-----------	---	---	--

1	0,581	64,6	111
5	0,599	29,9	49,9

Ensayo 7: Ensayo de supervivencia de eosinófilos mediado por IL- 5

La potencia de los compuestos de prueba para la supervivencia de eosinófilos mediada por IL- 5 se puede medir en eosinófilos humanos aislados de sangre completa humana (AllCells). Debido a que IL- 5 señala a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Los eosinófilos humanos se aíslan de sangre entera humana fresca (AllCells) de donantes sanos. La sangre se mezcla con dextrano al 4,5% (Sigma- Aldrich) en una solución de cloruro de sodio al 0,9% (Sigma-Aldrich). Los glóbulos rojos se dejan sedimentar durante 35 minutos. La capa superior rica en leucocitos se retira y se coloca sobre Ficoll- Paque (GE Healthcare) y se centrifuga a 600 g durante 30 minutos. Las capas de células mononucleares y de plasma se eliminan antes de lisar la capa de granulocitos con agua para eliminar los glóbulos rojos contaminantes. Los eosinófilos se purifican aún más utilizando un equipo de aislamiento de eosinófilos humanos (Miltenyi Biotec). Una fracción de los eosinófilos purificados se incuba con FITC anti- CD16 (Miltenyi Biotec) durante 10 minutos a 4 °C en la oscuridad. La pureza se analiza usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences).

Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en RPMI 1640 (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a 10.000 células/pocillo en medios (50 µL). La placa se centrifuga a 300 g durante 5 minutos y se eliminan los sobrenadantes. Los compuestos se diluyen en serie en DMSO y luego se diluyen otras 500 veces hasta una concentración de ensayo final 2x en medios.

Los compuestos de prueba (50 μ L/pocillo) se agregan a las células y se incuban a 37 °C, CO₂ al 5% durante 1 hora, seguido de la adición de IL- 5 (R&D Systems; concentraciones finales 1 ng/mL y 10 pg/mL) en medios de ensayo precalentado (50 μ L) durante 72 horas.

Después de la estimulación con citocina, las células se centrifugan a 300 g durante 5 min y se lavan dos veces con DPBS frío (Life Technologies). Para acceder a la viabilidad y la apoptosis, las células se incuban con yoduro de propidio (Thermo Fisher Scientific) y APC Annexin V (BD Biosciences) y se analizan utilizando un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences). Los valores de CI₅₀ se determinan a partir del análisis de las curvas de viabilidad del porcentaje de viabilidad celular frente a la concentración del compuesto. Los datos se expresan como valores pIC₅₀ (logaritmo decádico negativo IC₅₀).

Ensayo 8: Inhibición de las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 inducidas por IFN γ e IL- 27 en cultivos humanos 3D de vías respiratorias

Los cultivos de tejido de EpiAirway se pueden obtener de Mattek (AIR- 100). Los cultivos se obtienen de donantes asmáticos. En un inserto de cultivo celular, las células epiteliales traqueales/bronquiales derivadas de humanos se cultivan y diferencian sobre un soporte de membrana porosa, lo que permite una interfaz aire- líquido con medio de cultivo calentado debajo de las células y una atmósfera de prueba gaseosa arriba. Los tejidos se cultivan en medios de mantenimiento (Mattek, AIR- 100- MM) en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37 °C. Se pueden probar cuatro donantes. El día 0, los cultivos de tejidos se tratan con compuestos de prueba a 10 μ M, 1 μ M y/o 0,1 μ M. Los compuestos se diluyen en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) hasta una concentración final del 0,1%. Se puede utilizar DMSO al 0,1% como control de vehículo. Los compuestos de prueba se incuban con cultivos durante 1 hora a 37 °C, CO₂ al 5%, seguido de la adición de medios precalentados que contienen IFN γ (R&D Systems) o IL- 27 (R&D Systems) a una concentración final de 100 ng/mL. Los cultivos de tejidos se mantienen durante 8 días. Los

medios se reemplazan cada 2 días con medios frescos que contienen compuestos e IFN γ o IL- 27. El día 8, se recogen los cultivos de tejidos y los sobrenadantes para su análisis. Las muestras de sobrenadante se analizan para CXCL10 (IP- 10) y CXCL9 (MIG) usando análisis luminex (EMD Millipore). Los datos se expresan como % de inhibición $\pm$ desviación estándar ($\pm$ STDV). El porcentaje de inhibición se determina mediante la potencia inhibidora del compuesto contra la secreción de CXCL10 o CXCL9 inducida por IFN γ o IL- 27 en comparación con las células tratadas con vehículo. Los datos son el promedio de 3 o 4 donantes.

Ensayo 9: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de IFN γ estimulado por IL- 2/anti- CD3 en PBMC humanas

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de interferón gamma (IFN γ) estimulado por interleucina-2 (IL-2)/anti-CD3 se puede medir en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) aisladas de sangre completa humana (Stanford Blood Center). Debido a que IL- 2 señala a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

(1) Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre humana completa de donantes sanos usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO $_2$ al 5% en RPMI (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se siembran a 200.000 células/pocillo en medios (50 μ L) y se cultivan durante 1 h. Los compuestos se diluyen en serie en DMSO y luego se diluyen otras 500 veces (hasta una concentración de ensayo final 2x) en medios. Los compuestos de prueba (100 μ L/pocillo) se agregan a las células y se incuban a 37 °C, CO $_2$ al 5% durante 1 h, seguido de la adición de IL- 2 (R&D Systems; concentración final 100 ng/mL) y anti- CD3

(BD Biosciences; concentración final 1 µg/mL) en medios de ensayo precalentado (50 µL) durante 24 h.

(2) Después de la estimulación con citocinas, las células se centrifugan a 500 g durante 5 min y se extraen los sobrenadantes y se congelan a -80 °C. Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba en respuesta a IL- 2/anti- CD3, se miden las concentraciones de IFN γ sobrenadante mediante ELISA (R&D Systems). Los valores de IC_{50} se determinan a partir del análisis de las curvas de inhibición de la concentración de IFN γ frente a la concentración del compuesto. Los datos se expresan como valores pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}).

Ensayo 10: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT5 estimulada por IL- 2 en células T CD4+

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por interleucina- 2 (IL- 2)/anti- CD3 se puede medir en células T CD4 positivas (CD4+) en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) aisladas de sangre completa humana (Stanford Blood Center) mediante citometría de flujo. Debido a que IL- 2 señala a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Las células T CD4+ se identifican utilizando un anticuerpo anti- CD4 conjugado con ficoeritrobilina (PE) (Clon RPA- T4, BD Biosciences), mientras que un anticuerpo anti- pSTAT5 conjugado con Alexa Fluor 647 (pY694, Clon 47, BD Biosciences) se utiliza para detectar fosforilación STAT5.

(1) Se sigue el protocolo del ensayo 9, párrafo (1), con la excepción de que la estimulación de citocinas con anti- CD3 se realiza durante 30 min en lugar de 24 h.

(2) Después de la estimulación con citocinas, las células se fijan con solución de fijación precalentada (200 µL; BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C, CO $_2$ al 5%, se lavan dos veces con amortiguador DPBS (1 mL, Life

Technologies) y se resuspenden en Perm Buffer III enfriado con hielo (1000 μ L, BD Biosciences) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces con FBS al 2% en DPBS (amortiguador FACS) y luego se resuspenden en amortiguador FACS (100 μ L) que contiene PE anti- CD4 (dilución 1:50) y anti- CD3 Alexa Fluor 647 anti-CD3 (dilución 1:5) durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavan dos veces en amortiguador FACS antes de analizarlas usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Para determinar la potencia inhibidora de los compuestos de prueba en respuesta a IL-2/anti- CD3, se mide la intensidad fluorescente media (MFI) de pSTAT5 en células T CD4+. Los valores de CI_{50} se determinan a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}).

Ensayo 11: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT6 estimulada por IL- 4 en células T CD3+

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT6 estimulada por interleucina- 4 (IL- 4) se puede medir en células T CD3 positivas (CD3+) en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) aisladas de sangre completa humana (Stanford Blood Center) mediante citometría de flujo. Debido a que IL- 4 señala a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Las células T CD3+ se identifican utilizando un anticuerpo anti- CD3 conjugado con ficoeritrobilina (PE) (Clon UCHT1, BD Biosciences), mientras que un anticuerpo anti- pSTAT6 conjugado con Alexa Fluor 647 (pY641, Clon 18/P, BD Biosciences) se utiliza para detectar fosforilación STAT6.

Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre humana completa de donantes sanos como en los Ensayos 9 y 10. Las células se siembran a 250.000 células/pocillo en medios (200 μ L), se cultivan durante 1 h y luego se resuspenden en medios de ensayo (50 μ L)

(RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1% (Sigma), glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X) que contienen diversas concentraciones de compuestos de prueba. Los compuestos se diluyen en serie en DMSO y luego se diluyen otras 500 veces (hasta una concentración de ensayo final 2x) en medios de ensayo. Los compuestos de prueba (50 μ L) se incuban con células a 37 °C, CO₂ al 5% durante 1 h, seguido de la adición de IL- 4 (50 μ L) (R&D Systems; concentración final 20 ng/mL) en medios de ensayo precalentado durante 30 min. Después de la estimulación con citocinas, las células se fijan con solución de fijación precalentada (100 μ L) (BD Biosciences) durante 10 min a 37°C, CO₂ al 5%, se lavan dos veces con amortiguador FACS (1 mL) (FBS al 2% en DPBS) y se resuspenden en amortiguador Perm III enfriado con hielo (1000 μ L) (BD Biosciences) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces con amortiguador FACS y luego se resuspenden en amortiguador FACS (100 μ L) que contiene PE anti- CD3 (dilución 1:50) y Alexa Fluor 647 anti-pSTAT6 (dilución 1:5) durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavan dos veces en amortiguador FACS antes de analizarlas usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences).

Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba en respuesta a IL- 4, se mide la intensidad fluorescente media (MFI) de pSTAT6 en células T CD3 +. Los valores de CI₅₀ se determinan a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como pIC₅₀ (logaritmo decádico negativo IC₅₀).

Ensayo 12: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT3 estimulada por IL- 6 en células T CD3+

Puede usarse un protocolo análogo al del Ensayo 11 para determinar la potencia del compuesto de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT3 estimulada por interleuken- 6 (IL- 6). Se usa un anticuerpo

anti- pSTAT3 conjugado con Alexa Fluor 647 (pY705, Clon 4/P, BD Biosciences) para detectar la fosforilación de STAT3.

Ensayo 13: Modelo murino de inflamación eosinofílica del pulmón inducida por *Alternaria alternata*

La eosinofilia de las vías respiratorias es una característica del asma humana. La *Alternaria alternata* es un aeroalergeno fúngico que puede exacerbar el asma en humanos e induce inflamación eosinofílica en los pulmones de ratones (Havaux *et al. Clin Exp Immunol.* **2005** Feb;139(2):179- 88). En ratones, se ha demostrado que alternaria activa indirectamente células linfoides innatas de tipo 2 residentes en el tejido en el pulmón, que responden (p. ej., IL- 2 e IL- 7) y liberan citocinas dependientes de JAK (p. ej., IL- 5 e IL- 13) y coordinar la inflamación eosinofílica (Bartemes *et al. J Immunol.* **2012** 1 de Feb;188(3):1503-13).

En el estudio se pueden utilizar ratones C57 macho de siete a nueve semanas de edad de Taconic. El día del estudio, los animales se anestesian ligeramente con isoflurano y se les administra vehículo o compuesto de prueba (0,03 - 1,0 mg/mL, 50 μ L de volumen total durante varias respiraciones) mediante aspiración oral. Los animales se colocan en decúbito lateral después de la dosis y se controla su recuperación completa de la anestesia antes de ser devueltos a su jaula de origen. Una hora más tarde, los animales se vuelven a anestesiarse brevemente y se exponen a vehículo o extracto de alternaria (200 μ g de extracto total administrado, 50 μ L de volumen total) mediante aspiración orofaríngea antes de controlarse su recuperación de la anestesia y devolverse a su jaula. Cuarenta y ocho horas después de la administración de alternaria, se recoge líquido de lavado broncoalveolar (BALF) y se cuentan los eosinófilos en el BALF utilizando el sistema de hematología Advia 120 (Siemens). La actividad en el modelo se prueba por una disminución en la cantidad de eosinófilos presentes en el BALF de los animales tratados a las cuarenta y ocho horas en comparación con los animales de control expuestos a alternaria

tratados con vehículo. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición de la respuesta de eosinófilos de BALF estimulados con alternaria tratada con vehículo. Para calcular el porcentaje de inhibición, el número de eosinófilos BALF para cada enfermedad se convierte en porcentaje de los eosinófilos BALF estimulados con alternaria tratados con vehículo promedio y se resta del cien por ciento.

Ensayo 14: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT1 inducida por IFN γ

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT1 estimulada por interferón gamma (IFN γ) se midió en monocitos CD14 positivos (CD14+) derivados de sangre completa humana (Stanford Blood Center) usando citometría de flujo. Debido a que el IFN γ envía señales a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Los monocitos se identificaron utilizando un anticuerpo anti- CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Clon RM052, Beckman Coulter) y se utilizó un anticuerpo anti- pSTAT1 conjugado con Alexa Fluor 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 humana completa de donantes sanos usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal (FBS, Life Technologies) al 10%, 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a 250.000 células/pocillo en medios (200 μ L), se cultivaron durante 2 h y se resuspendieron en medios de ensayo (50 μ L) (RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1% (Sigma), glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X) que contienen diversas concentraciones del compuesto de prueba. El compuesto se diluyó en serie en DMSO y luego se diluyó otras 1000

veces en medios para que la concentración final de DMSO alcanzara el 0,1%. Las diluciones del compuesto de prueba se incubaron con células a 37 °C, CO₂ al 5% durante 1 h, seguido de la adición de IFN γ precalentado (R&D Systems) en medios (50 μ L) a una concentración final de 0,6 ng/mL durante 30 min. Después de la estimulación con citocinas, las células se fijaron con solución de fijación precalentada (100 μ L) (BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C, CO₂ al 5%, se lavaron dos veces con amortiguador FACS (1 mL) (BSA al 1% en PBS), resuspendido en 1:10 anti- CD14 FITC:amortiguador FACS (100 μ L) y se incubó a 4 °C durante 15 min. Las células se lavaron una vez y luego se resuspendieron en amortiguador Perm III (BD Biosciences) enfriado con hielo (100 μ L) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS y luego se resuspendieron en 1:10 Alexa Fluor 647 anti- pSTAT1:amortiguador FACS (100 μ L) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron dos veces en amortiguador FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi).

Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba, se midió la intensidad fluorescente media (MFI) de pSTAT1 en monocitos CD14+. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores pCI₅₀ (logaritmo decádico negativo IC₅₀). El compuesto **1** mostró un valor de pCI₅₀ de 7,5 en este ensayo. El compuesto **4** mostró un valor de pCI₅₀ de 7,3 en este ensayo.

Ensayo 15: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT5 inducida por GM-CSF

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por el factor estimulante de colonias de macropágina de granulocitos (GM- CSF) se midió en monocitos CD14 positivos (CD14+) derivados de sangre completa humana (Stanford Blood Center)

usando citometría de flujo. Debido a que el GM-CSF envía señales a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Los monocitos se identificaron utilizando un anticuerpo anti- CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Clon RM052, Beckman Coulter) y se utilizó un anticuerpo anti- pSTAT5 conjugado con Alexa Fluor 647 (pY694, BD Biosciences) para detectar la fosforilación de STAT5.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre humana completa de donantes sanos usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en RPMI (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal (FBS, Life Technologies) al 10%, 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25 mM HEPES (Life Technologies) y Pen/Strep 1X (Life Technologies). Las células se sembraron a 250.000 células/pocillo en medios (200 µL), se cultivaron durante 2 h y se resuspendieron en medios de ensayo (50 µL) (RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1% (Sigma), glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X) que contienen diversas concentraciones de los compuestos de prueba. El compuesto se diluyó en serie en DMSO y luego se diluyó otras 1000 veces en medios para que la concentración final de DMSO alcanzara el 0,1%. Las diluciones del compuesto de prueba se incubaron con células a 37 °C, CO₂ al 5% durante 1 h, seguido de la adición de GM-CSF precalentado (R&D Systems) en medios (50 µL) a una concentración final de 0,3 ng/mL durante 15 min. Después de la estimulación con citocinas, las células se fijaron con solución de fijación precalentada (100 µL) (BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C, CO₂ al 5%, se lavaron dos veces con amortiguador FACS (1 mL) (BSA al 1% en PBS), resuspendido en 1:10 anti- CD14 FITC:amortiguador FACS (100 µL) y se incubó a 4 °C durante 15 min. Las células se lavaron una vez y luego se resuspendieron en amortiguador Perm III (BD Biosciences) enfriado con hielo (100 µL) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS y luego se resuspendieron en 1:10 Alexa Fluor 647

anti- pSTAT1:amortiguador FACS (100 μ L) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron dos veces en amortiguador FACS y se analizaron usando un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi).

Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba, se midió la intensidad fluorescente media (MFI) de pSTAT5 en monocitos CD14+. Los valores de CI_{50} se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como valores pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}). El compuesto **1** mostró un valor de pCI_{50} de 6,7 en este ensayo. El compuesto **4** mostró un valor de pCI_{50} de 6,7 en este ensayo.

Ensayo 16: Ensayo de potencia del JAK celular: Inhibición de pSTAT4 inducida por IL- 12

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT4 estimulada por interleucina- 12 (IL- 12) se midió en células T CD3 positivas (CD3+) derivadas de sangre completa humana (Stanford Blood Center) usando citometría de flujo. Debido a que IL- 12 señala a través de JAK, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK.

Las células T CD3+ se identificaron utilizando un anticuerpo anti- CD3 conjugado con ficoeritrina (PE) (clon UCHT1, BD Biosciences) y un anticuerpo anti- pSTAT4 conjugado con Alexa Fluor 647 (clon 38/p- Stat4, BD Biosciences) se utilizó para detectar fosforilación STAT4.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de sangre humana completa de donantes sanos usando un gradiente de ficoll. Las células se cultivaron en RPMI (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Life Technologies), glutamax 2 mM (Life Technologies), HEPES 25 mM (Life Technologies), Pen/Strep 1X (Life Technologies), unidas a placa anticuerpo anti- CD3 purificado (5 μ g/mL, clon UCHT1, BD Biosciences) y anticuerpo anti- CD28 soluble (1 μ g/mL, clon

CD28.2, BD Biosciences) durante 3 días en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37 °C. Las células se recogieron, se lavaron con medios y luego se resuspendieron en medios que contenían interleucina- 2 (IL- 2, 10 ng/mL, R&D Systems). Las células se cultivaron durante 3 días en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% a 37 °C. Las células se recolectaron, se lavaron con RPMI y se sembraron a 250.000 células/pocillo en medios (200 µL), se cultivaron durante 2 h y se resuspendieron en medios de ensayo (50 µL) (RPMI suplementado con albúmina de suero bovino al 0,1% (Sigma), glutamax 2 mM, HEPES 25 mM y Penstrep 1X) que contienen diversas concentraciones de los compuestos de prueba. El compuesto se diluyó en serie en DMSO y luego se diluyó otras 1000 veces en medios para que la concentración final de DMSO alcanzara el 0,1%. Las diluciones del compuesto de prueba se incubaron con células a 37 °C, CO₂ al 5% durante 1 h, seguido de la adición de IL- 12 precalentada (R&D Systems) en medios (50 µL) a una concentración final de 10 ng/mL para 30 minutos. Después de la estimulación con citocinas, las células se fijaron con solución de fijación precalentada (100 µL) (BD Biosciences) durante 10 min a 37 °C, CO₂ al 5%, se lavaron dos veces con amortiguador FACS (1 mL) (BSA al 1% en PBS) y resuspendido en amortiguador Perm III enfriado con hielo (1000 µL) (BD Biosciences) durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS y luego se resuspendieron en amortiguador FACS (100 µL) que contenía PE anti- CD3 (dilución 1:50) y Alexa Fluor 647 anti- pSTAT4 (dilución 1:10) durante 45 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces en amortiguador FACS antes de analizarlas usando un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi). Para determinar la potencia inhibidora del compuesto de prueba, se midió la intensidad fluorescente media (MFI) de pSTAT4 en células T CD3+. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de MFI frente a la concentración de compuesto. Los datos se expresan como

valores pIC_{50} (logaritmo decádico negativo IC_{50}). El compuesto **1** mostró un valor de pIC_{50} de 6,2 en este ensayo. El compuesto **4** mostró un valor de pIC_{50} de 6,0 en este ensayo.

Estructura Cristalinas

Se obtuvo una estructura cocrystalina del compuesto **D- 1** unido a JAK1 humano con una resolución de 2,28 Å. Se observó que el ligando se unía en el sitio de unión de ATP. Se identificaron siete interacciones de enlaces de hidrógeno específicas basándose en una distancia de 3,5 Å o menos entre los átomos donadores y aceptores. De particular interés, se identificó una interacción de enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la amida exocíclica del compuesto **D- 1** y la cadena lateral de Arg879 de JAK1. Se puede esperar una interacción similar para los compuestos de la invención. En estudios de modelado anteriores, esta interacción se había propuesto como una forma de proporcionar selectividad para JAK1 sobre otras tirosina cinasas, ya que las cinasas estrechamente relacionadas (p. ej., TRKA, VEGFR, ABL1) no poseían un residuo de arginina en la ubicación equivalente. Los resultados observados de la interacción del enlace de hidrógeno en la estructura cristalina y la selectividad mejorada del cinoma en comparación con las series que no poseen la amida exocíclica validan esta hipótesis de diseño.

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a aspectos específicos o realizaciones de esta, los expertos en la técnica comprenderán que pueden hacerse diversos cambios o que pueden sustituirse equivalentes sin apartarse del espíritu y el alcance auténticos de la invención. Además, en la medida permitida por los estatutos y reglamentos de patentes aplicables, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada documento se hubiera incorporado individualmente por referencia en el presente documento.