

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

COMPUESTOS BICÍCLICOS DE PIRAZOL Y TRIAZOLO COMO INHIBIDORES DE LAS CINASAS JAK

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La invención se dirige a los compuestos bicíclicos de pirazol y triazolo útiles como inhibidores de las cinasas JAK y más particularmente como inhibidores de la JAK3 que son selectivos para JAK3 por encima de otros miembros de la familia de las cinasas JAK, tales como JAK1, JAK2 y TYK2. La invención también se dirige a las formas cristalinas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, a métodos de uso de dichos compuestos para tratar las enfermedades inflamatorias y a los procesos y productos intermedios útiles para la preparación de dichos compuestos.

Estado actual de la técnica

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria crónica del colon. La enfermedad se caracteriza por la inflamación y la ulceración de la capa de la mucosa del recto y del intestino grueso. Los síntomas incluyen diarrea, deposiciones con sangre y dolor abdominal. La evolución clínica es intermitente, marcada por períodos alternantes de empeoramiento y remisión. La incidencia parece ser mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo. Un estimado de 1,2 millones de personas en los países industrializados más importantes padecen colitis ulcerosa y se prevé que aumentará la cantidad junto con el crecimiento de la población. Los pacientes con colitis ulcerosa tienen un aumento en el riesgo de contraer cáncer colorrectal. (p. ej. Danese *et al.* *N Engl J Med*, **2011**, 365, 1713-1725). Aunque existe una variedad de opciones terapéuticas para favorecer y mantener la remisión de la colitis ulcerosa (UC) en los pacientes, ninguna es la ideal. Aún hay una necesidad médica insatisfecha de un tratamiento eficaz para favorecer y mantener la remisión de la UC de moderada a grave sin que haya inquietudes de seguridad causadas por la inmunosupresión sistémica crónica.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Aunque no está clara la patogénesis precisa de la UC, es evidente que las citocinas proinflamatorias cumplen un papel fundamental en la respuesta inmunitaria (Strober *et al.*, *Gastroenterol*, **2011**, 140, 1756-1767). Muchas de las citocinas proinflamatorias que se elevan con mayor frecuencia en la UC (p. ej., IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-23, IL-24, IFN γ y leptina) dependen de la familia JAK de las tirosinas cinasas (es decir, JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) para la transducción de señal.

La inhibición de la enzima JAK3 bloquea la señalización de muchas citocinas proinflamatorias clave. Por lo tanto, es probable que los inhibidores de la JAK3 sean útiles en el tratamiento de la colitis ulcerosa y de otras enfermedades gastrointestinales inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn y la colitis inducida por el inhibidor de puntos de control inmunitario. También es probable que los inhibidores de la JAK3 sean útiles para el tratamiento de las enfermedades cutáneas inflamatorias, tales como la dermatitis atópica y los trastornos respiratorios inflamatorios, tales como la rinitis alérgica, el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además, los inhibidores de la JAK3 también pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades oculares en las cuales la inflamación tiene un papel destacado, tales como la uveítis, la retinopatía diabética, el edema macular diabético, la enfermedad del ojo seco, la degeneración macular relacionada con la edad, la oclusión de la vena retiniana (OVR) y la queratoconjuntivitis atópica.

Se prevé que la selectividad para JAK3 por encima de JAK1 sea beneficiosa ya que hay evidencia de que la selectividad de JAK3 permite la conservación de citocinas posiblemente beneficiosas, tales como IL-10, que estuvo involucrada en la sanación de la mucosa, IL-22 que cumple una función en la protección de la barrera del moco y la regeneración epitelial e IL-6 que tiene un rol en la proliferación de las células epiteliales intestinales. La selectividad para JAK3 sobre JAK2 también permite la conservación de la señalización de la eritropoyetina (EPO) y de la trombopoyetina (TPO). Por lo tanto, se recomienda proporcionar nuevos compuestos que sean selectivos de los inhibidores de la

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

JAK3 por encima de otros miembros de la familia de las cinasas JAK tales como JAK1, JAK2 y TYK2.

Por último, debido al efecto modulador de la vía de la JAK/STAT en el sistema inmunitario, la exposición sistémica a los inhibidores de la JAK puede tener un efecto inmunosupresor sistémico adverso. Por lo tanto, se recomienda proporcionar nuevos inhibidores de la JAK3 que tengan efecto en el lugar de acción sin efectos sistémicos significativos. En particular, para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales inflamatorias, tal como la colitis ulcerosa, se recomienda proporcionar nuevos inhibidores de la JAK3 que se puedan administrar por vía oral y lograr una exposición terapéuticamente relevante en el tubo digestivo con una exposición sistémica mínima. Para las enfermedades cutáneas, se recomienda proporcionar nuevos inhibidores de la JAK3 que se puedan administrar de forma tópica en la piel con una exposición sistémica mínima.

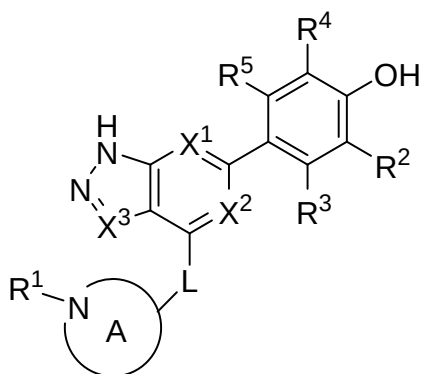
Por lo tanto, se recomienda proporcionar nuevos compuestos que sean selectivos de los inhibidores de la JAK3 por encima de otros miembros de la familia de las cinasas JAK tales como JAK1, JAK2 y TYK2 y que tengan una exposición sistémica mínima.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención proporciona compuestos nuevos que tienen actividad como inhibidores de las cinasas JAK y, más particularmente, como inhibidores de la JAK3.

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

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

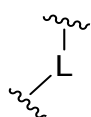


(I)

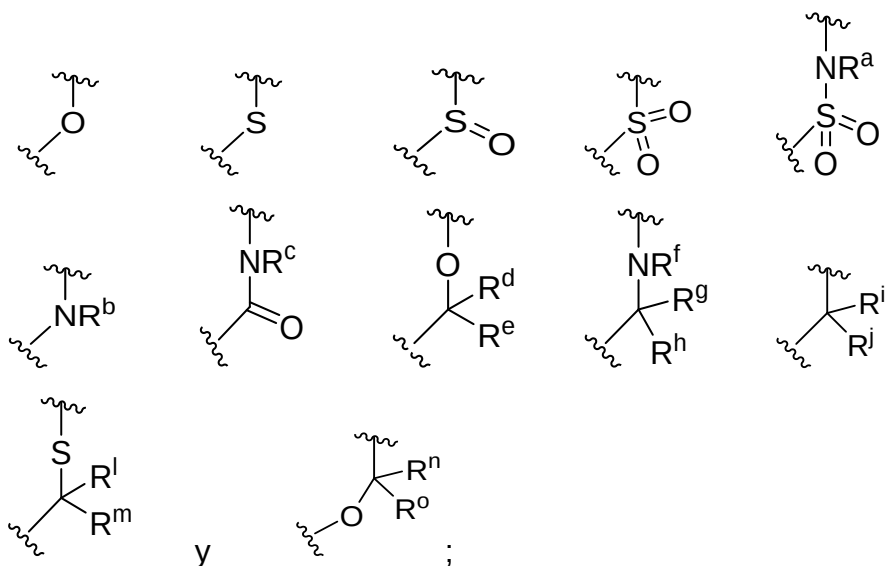
o una sal de este aceptable en términos farmacéuticos, donde:

X^1 y X^2 se seleccionan cada uno de manera independiente de N y CH;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en N, CH, C-CH₃, C-CF₃, C-CHF₂, C-CH₂-O-CH₃, C-SMe, C-NMe₂, C-NH-CH₃, C-Cl, C-CN y C-OMe;



se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:



R^a , R^b , R^c y R^f se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₃;

R^d , R^e , R^g , R^h , R^i , R^j , R^l , R^m , R^n y R^o se seleccionan de manera independiente del grupo compuesto por H y alquilo C₁₋₃, donde el grupo alquilo C₁₋₃ puede sustituirse, opcionalmente, por 1 a 3 halógenos;

Opcionalmente, R^d y R^e pueden unirse para formar un anillo ciclopropilo;

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

A se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

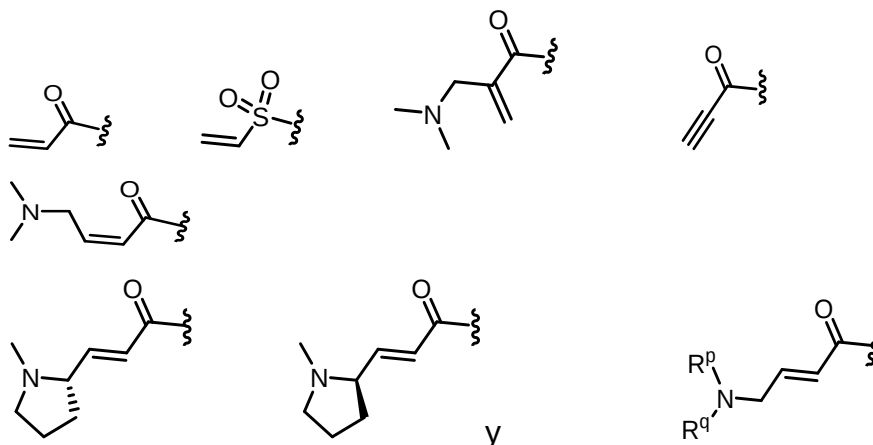
(a) un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 10 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S, S(O)₂ y O, y

(b) un grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O,

donde L está unido a un átomo de carbono en A y A se sustituye opcionalmente con 1 a 3 grupos R^k;

cada R^k se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en F, CN, alcoxi C₁₋₃, ciclopropilo y alquilo C₁₋₃, donde el grupo alquilo C₁₋₃ puede sustituirse opcionalmente con OH, OMe o de 1 a 3 halógenos;

R¹ se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:



donde R^p y R^q se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consiste en cicloalquilo H, C₃₋₅ y alquilo C₁₋₆, donde el grupo alquilo C₁₋₆ puede sustituirse opcionalmente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en alcoxi C₁₋₃ y alquilo -S-C₁₋₃,

o R^p y R^q forman un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O, donde el grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros se sustituye opcionalmente con 1 a 3

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-3} , alquilo-S- C_{1-3} y alquilo- C_{1-3} -alcoxi- C_{1-3} ;

R^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl, OMe, Me y F;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en H y F;

R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y F; y

R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, Me y F.

La divulgación también proporciona algunas formas cristalinas de determinados compuestos, Forma 1, Forma 2, Forma 2b, Forma 3 y Forma 4.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una forma cristalina de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un método para tratar la enfermedad gastrointestinal inflamatoria, en particular, la colitis ulcerosa, en un mamífero, el método comprende la administración al mamífero de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una forma cristalina de la divulgación, o una composición farmacéutica de la divulgación.

La invención también proporciona un método para tratar enfermedades inflamatorias o trastornos de la piel en un mamífero, el método comprende la aplicación de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica de la divulgación en la piel del mamífero.

La invención también proporciona un método para tratar el linfoma cutáneo de células T en un mamífero, el método comprende la aplicación de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en la piel del mamífero.

En otro aspecto, la invención también proporciona un proceso descrito en la presente, que es útil para preparar los compuestos de la divulgación.

La invención también proporciona un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente para usar en el tratamiento médico, así como también el uso de un compuesto de la

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una forma cristalina de este, en la fabricación de una formulación o un medicamento para tratar una enfermedad gastrointestinal inflamatoria, o una enfermedad inflamatoria de la piel en un mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varios aspectos de la presente invención se ilustran a modo de referencia con los dibujos que los acompañan.

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) de la Forma cristalina 1 del compuesto 3 (de aquí en adelante, Forma 1).

La Figura 2 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 1.

La Figura 3 muestra un gráfico de análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Forma cristalina 1.

La Figura 4 muestra un isoterma de adsorción de humedad dinámico (DMS) de la Forma cristalina 1 observado a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La Figura 5 muestra un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) de la Forma cristalina 2 del compuesto 3 (de aquí en adelante, Forma 2).

La Figura 6 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 2.

La Figura 7 muestra un gráfico de análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Forma cristalina 2.

La Figura 8 muestra un isoterma de adsorción de humedad dinámico (DMS) de la Forma cristalina 2 observado a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La Figura 9 muestra un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) de la Forma cristalina 3 del compuesto 1 (de aquí en adelante, Forma 3).

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

La Figura 10 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 3.

La Figura 11 muestra un gráfico de análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Forma cristalina 3.

La Figura 12 muestra un isoterma de adsorción de humedad dinámico (DMS) de la Forma cristalina 3 observado a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La Figura 13 muestra un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) de la Forma cristalina 4 del compuesto 1 (de aquí en adelante, Forma 4).

La Figura 14 muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma cristalina 4.

La Figura 15 muestra un gráfico de análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Forma cristalina 4.

La Figura 16 muestra un isoterma de adsorción de humedad dinámico (DMS) de la Forma cristalina 4 observado a una temperatura de aproximadamente 25 °C.

La Figura 17 muestra un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) de una forma cristalina deshidratada del compuesto 3 (de aquí en adelante, Forma 2b).

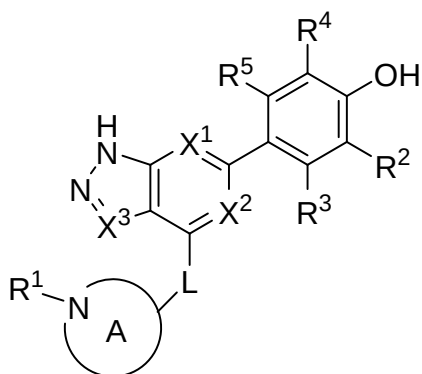
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Entre otros aspectos, la invención proporciona los inhibidores de las cinasas JAK de la fórmula (I) que son selectivos para JAK3 por encima de la familia cinasa de JAK tales como JAK1, JAK2 y TYK2, sales farmacéuticamente aceptables de estos y productos intermedios para la preparación de estos.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos nuevos que tienen actividad como inhibidores de las cinasas JAK, particularmente como inhibidores de la cinasa JAK3.

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

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

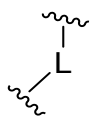


(I)

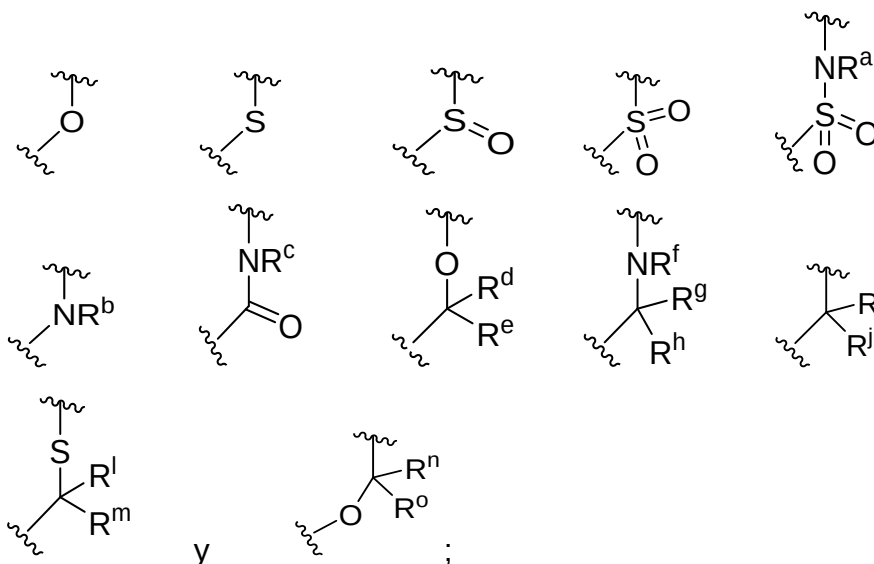
o una sal de este aceptable en términos farmacéuticos, donde:

X^1 y X^2 se seleccionan cada uno de manera independiente de N y CH;

X^3 se selecciona del grupo que consiste en N, CH, C-CH₃, C-CF₃, C-CHF₂, C-CH₂-O-CH₃, C-SMe, C-NMe₂, C-NH-CH₃, C-Cl, C-CN y C-OMe;



se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:



R^a , R^b , R^c y R^f se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₃;

R^d , R^e , R^g , R^h , R^i , R^j , R^l , R^m , R^n y R^o se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₃ en donde el grupo de

A se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

(b) un grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O,

cada R^k se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en F, CN, alcoxi C₁₋₃, ciclopropilo y alquilo C₁₋₃, donde el grupo alquilo C₁₋₃ puede sustituirse opcionalmente con OH, OMe o de 1 a 3 halógenos;

Chemical structures 1-6 are shown below the text:

- 1: C=C(C)C(=O)O (3-methylbut-3-en-2-one)
- 2: C=C(S(=O)(=O)C)C(=O)O (3-(sulfonylmethyl)but-3-en-2-one)
- 3: C=C(C)C(=O)O (3-methylbut-3-en-2-one)
- 4: C#CC(=O)O (but-3-en-2-one)
- 5: C=C(C)C(=O)O (3-methylbut-3-en-2-one)
- 6: C=C(C)C(=O)O (3-methylbut-3-en-2-one)

o R^p y R^q forman un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O, donde el grupo heterocíclico

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

monocíclico de 4 a 6 miembros se sustituye opcionalmente con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-3} , alquilo-S- C_{1-3} y alquilo- C_{1-3} -alcoxi- C_{1-3} ;

R^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl, OMe, Me y F;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en H y F;

R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y F; y

R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, Me y F.

En algunas realizaciones, X^3 es CH.

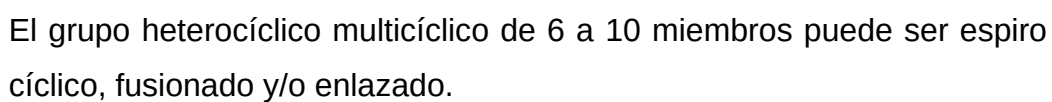
En algunas realizaciones, R^p y R^q se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consiste en H, ciclobutilo y alquilo C_{1-4} , en donde el grupo de alquilo C_{1-4} se puede sustituir opcionalmente con 1 o 2 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en alcoxi C_{1-2} y alquilo -S- C_{1-2} ,

o R^p y R^q forman un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de S y O, en donde el grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros se sustituye opcionalmente con 1 a 2 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consiste en alquilo C_{1-3} , alcoxi C_{1-2} , alquilo-S- C_{1-2} y alquilo- C_{1-3} -alcoxi- C_{1-2} .

En algunas realizaciones, R^p y R^q se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consta de H, ciclobutilo y alquilo C_{1-4} , en donde el grupo de alquilo C_{1-4} se puede sustituir opcionalmente con 1 o 2 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consta de OMe y -SEt,

o R^p y R^q forman un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y que opcionalmente contiene un heteroátomo adicional seleccionado de S, y O, en donde el grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros se sustituye opcionalmente con 1 o 2 sustituyentes seleccionados de manera independiente del grupo que consta de Me, OMe, CH_2OMe , y -SMe.

En algunas realizaciones, R^1 se selecciona del grupo que consta de



P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

En algunas realizaciones, el grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros es un grupo heterocíclico espiro cíclico. En algunas realizaciones, el grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros es un grupo heterocíclico fusionado. En algunas realizaciones, el grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros es un grupo heterocíclico enlazado.

En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consta de

(a) un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 8 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S, S(O)₂ y O, y

(b) un grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O,

donde L está unido a un átomo de carbono en A y A se sustituye opcionalmente con los grupos R^k de 1 a 3.

En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consta de

(a) un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S, S(O)₂ y O, y

(b) un grupo heterocíclico multicíclico de 6 a 10 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O,

donde L está unido a un átomo de carbono en A y A se sustituye opcionalmente con los grupos R^k de 1 a 3.

En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consta de:

(a) un grupo heterocíclico monocíclico de 4 a 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S, S(O)₂ y O, y

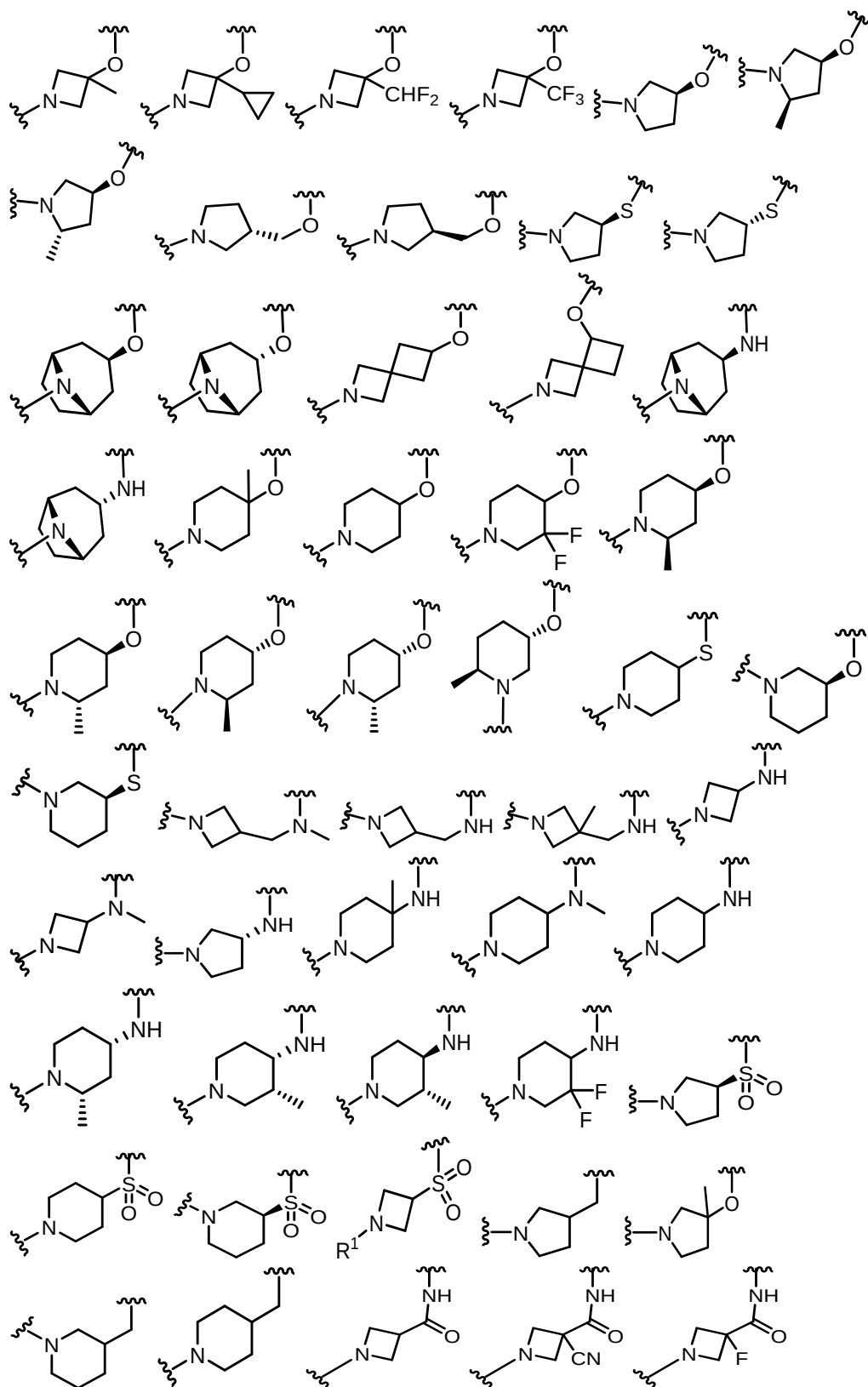
(b) un grupo heterocíclico monocíclico de 7 u 8 miembros que contiene un átomo de nitrógeno y, opcionalmente, que contiene un heteroátomo adicional seleccionado de N, S y O,

En algunas realizaciones, A se selecciona del grupo que consiste en azetidina, pirrolidina, piperidina, morfolina, 2-azaspiro[3,3]heptano, tiomorfolina y nortropano.

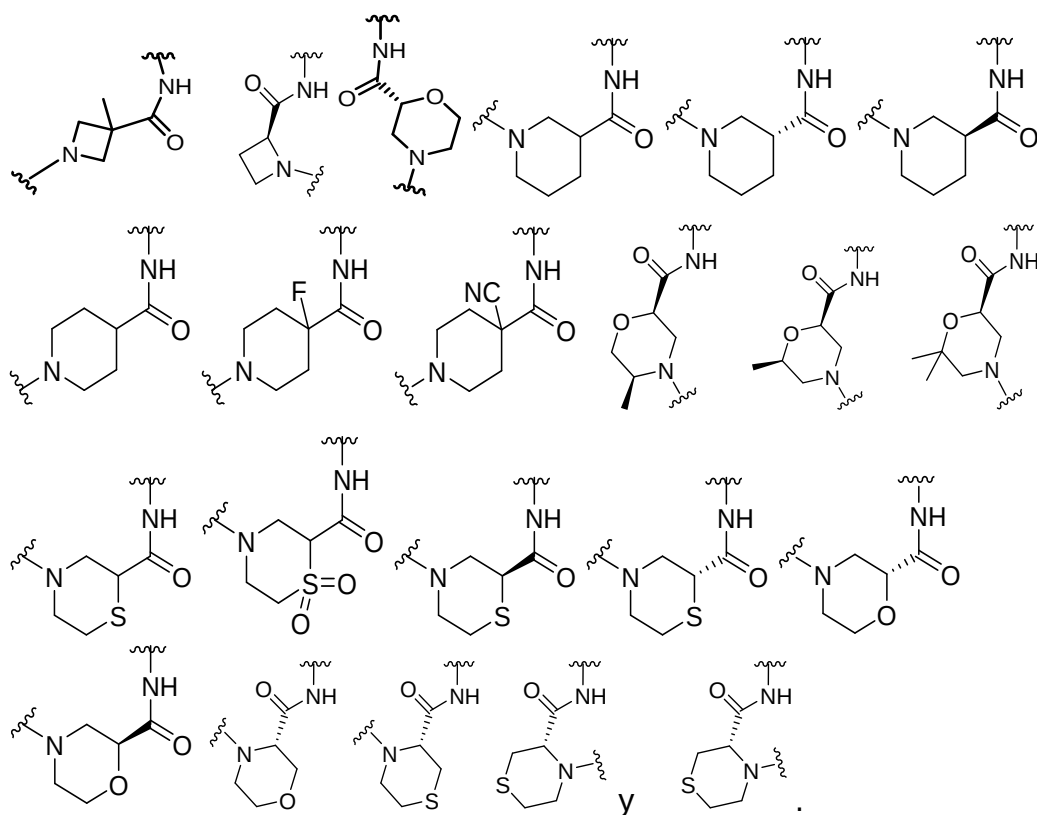
Chemical structures of various azetidine derivatives, including substituted azetidines and azetidine linkers, shown in a grid layout. The structures include:

- Substituted azetidines: 1-substituted azetidines, 2-substituted azetidines, 3-substituted azetidines, and 4-substituted azetidines.
- Azetidine linkers: Azetidines connected to other groups via ether, ester, and amide linkages.
- Functionalized azetidines: Azetidines with functional groups like hydroxyl, amino, and carboxyl groups.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

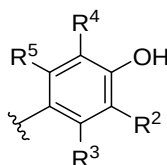


P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



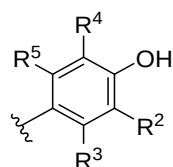
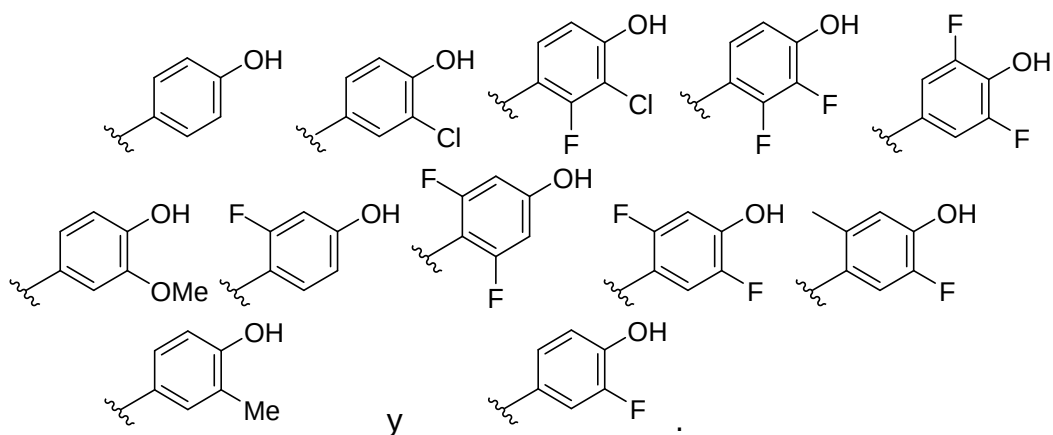
En algunas realizaciones, X^1 y X^2 son CH. En algunas realizaciones, X^1 es N y X^2 es CH. En algunas realizaciones, X^1 y X^2 son ambas N. En algunas realizaciones, X^1 es CH y X^2 es N.

En algunas realizaciones, R^2 es H. En algunas realizaciones, R^2 es F. En algunas realizaciones, R^2 es Cl. En algunas realizaciones, R^2 es OMe. En algunas realizaciones, R^2 es Me. En algunas realizaciones, R^3 es H. En algunas realizaciones, R^3 es F. En algunas realizaciones, R^4 es H. En algunas realizaciones, R^4 es F. En algunas realizaciones, R^5 es H. En algunas realizaciones, R^5 es F. En algunas realizaciones, R^5 es Me.

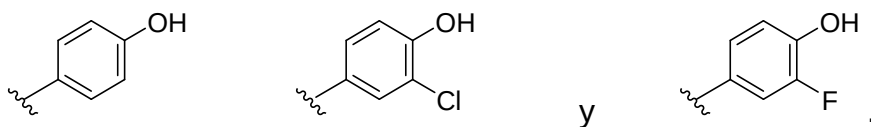


En algunas realizaciones, se selecciona del grupo que consiste en:

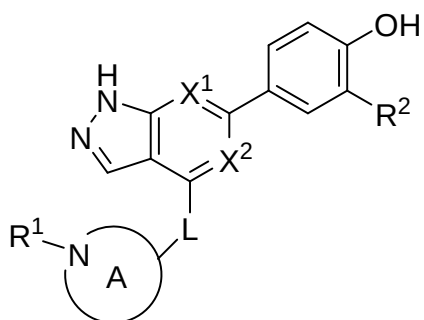
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



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



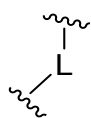
La invención también proporciona un compuesto de la fórmula (II):



(II)

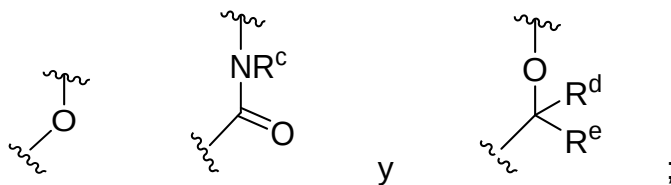
o una sal de este aceptable en términos farmacéuticos, donde:

X^1 y X^2 son ambos CH, o X^1 y X^2 son ambos N, o X^1 es N y X^2 es CH;



se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

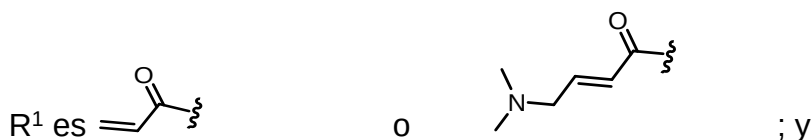


R^c , R^d , y R^e se seleccionan cada una de manera independiente del grupo compuesto por H y metilo;

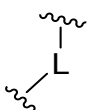
A se selecciona del grupo que consiste en azetidina, pirrolidina, piperidina y morfolina;

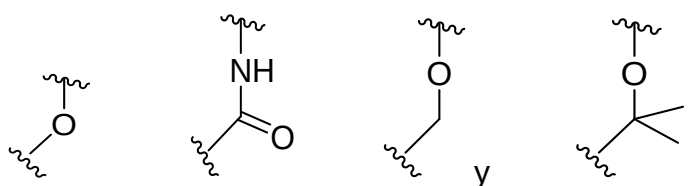
donde L está unido a un átomo de carbono en A y A se sustituye opcionalmente con 1 a 2 grupos R^k ;

cada R^k se selecciona de manera independiente del grupo que consiste en F, CN, metilo, etilo y haloalquilo C_{1-2} ;

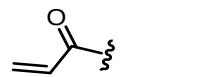


R^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl y F.

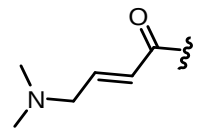
En algunas realizaciones,  se selecciona del grupo que consiste en



En algunas realizaciones, R^1 es

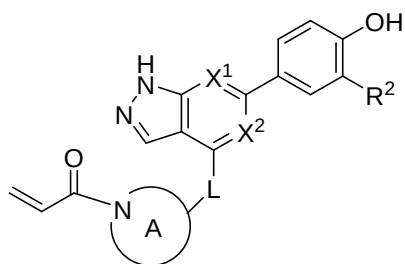


En algunas realizaciones, R^1 es

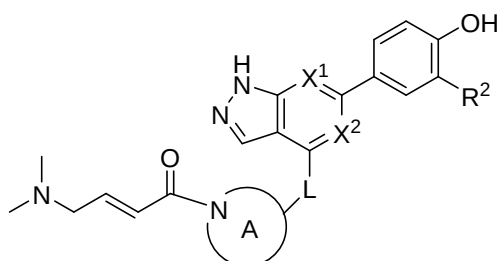


En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:

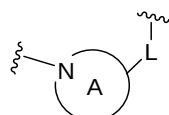
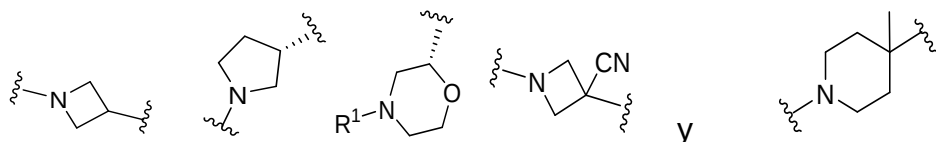
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



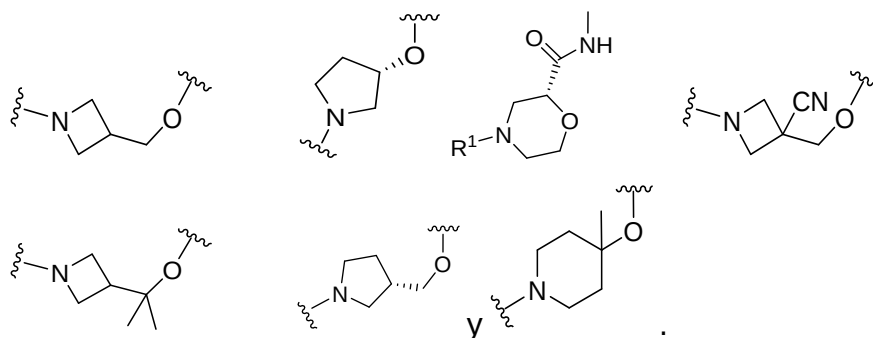
En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula:



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

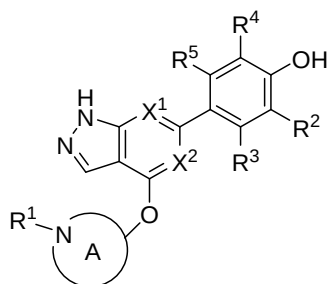


En algunas realizaciones, se selecciona del grupo que consiste en:

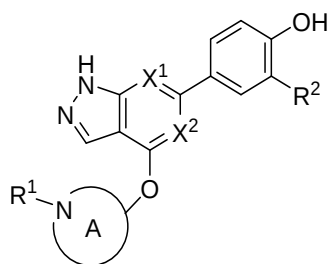


La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (Ia) o (IIa):

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



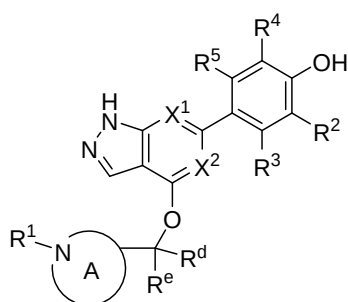
(Ia)



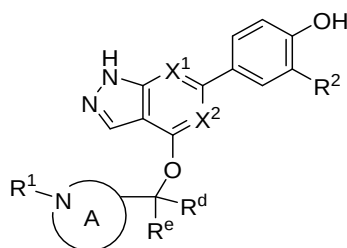
(IIa)

en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (Ib) o (IIb):



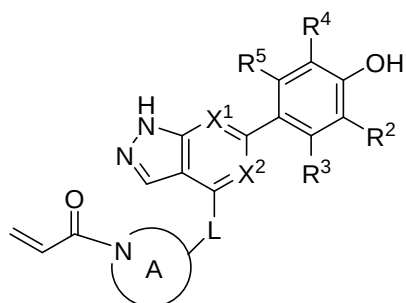
(Ib)



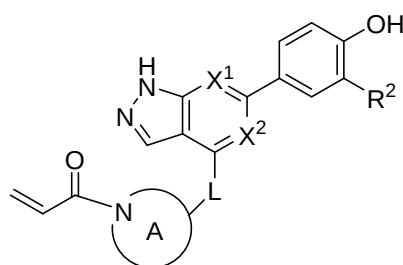
(IIb)

en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (Ic) o (IIc):



(Ic)

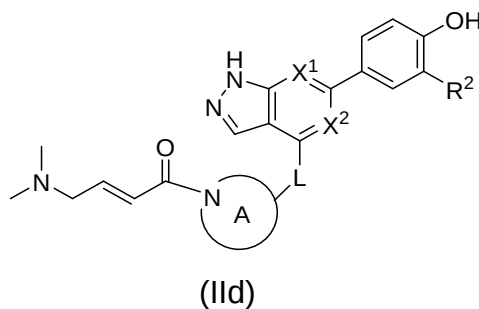
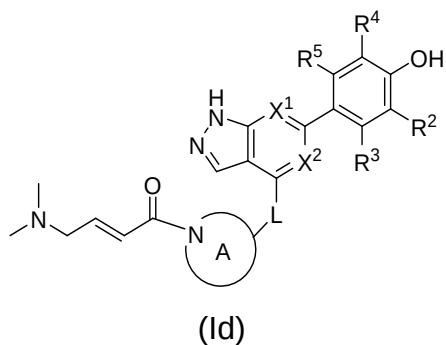


(IIc)

en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

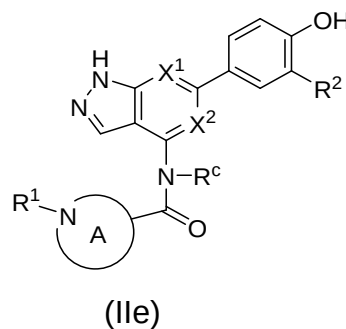
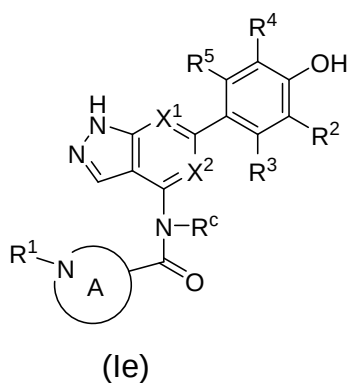
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (Id) o (IId):



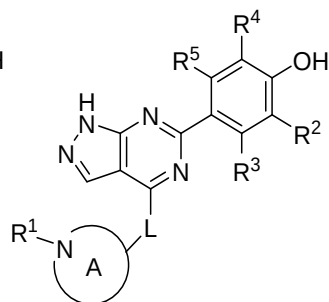
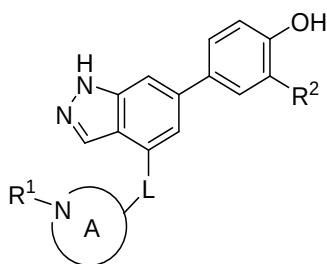
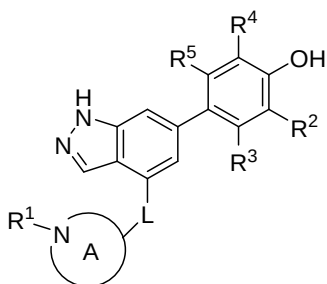
en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (Ie) o (IIe):



en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

La divulgación también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, de la fórmula (If), (IIIf), (IIIf), (IVf), (Vf), (VIIf), (VIIIf) o (VIIIIf):

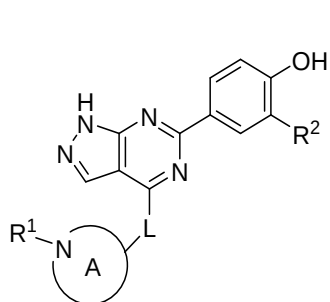


P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

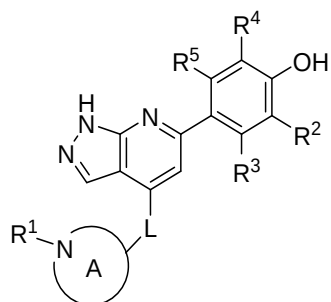
(If)

(IIIf)

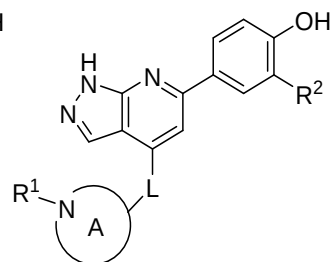
(IIIIf)



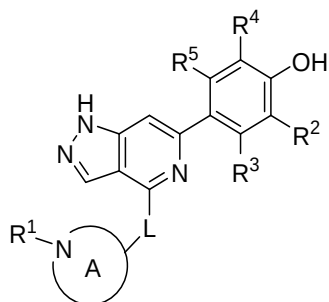
(IVf)



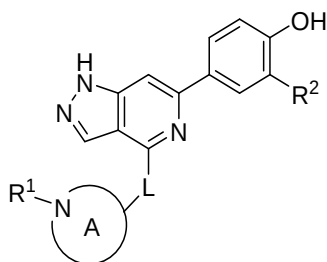
(Vf)



(VIIf)



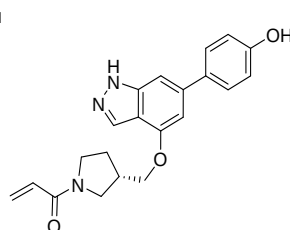
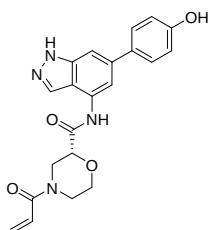
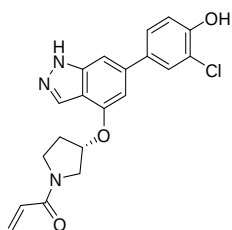
(VIIIf)



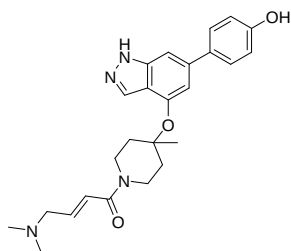
(VIIIIf)

en donde las variables son como se definieron en las realizaciones anteriores.

La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, seleccionado del grupo que consiste en

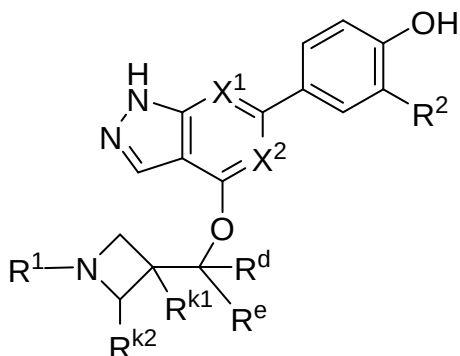


y



La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que tiene la fórmula (B):

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



(B)

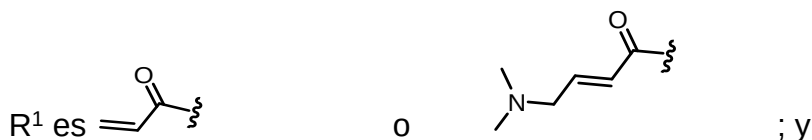
o una sal de este aceptable en términos farmacéuticos, donde:

X¹ y X² se seleccionan cada uno de manera independiente de N y CH;

R^d y R^e se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₃; opcionalmente, R^d y R^e pueden unirse para formar un anillo ciclopropilo;

R^{k1} se selecciona del grupo que consiste en H, F, CN, OMe y alquilo C₁₋₃;

R^{k2} se selecciona del grupo que consiste en H y metilo;

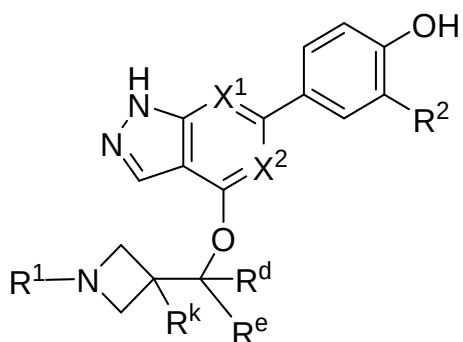


R² se selecciona del grupo que consiste en H, Cl y F.

En algunas realizaciones, R^d y R^e se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consiste en H y metilo; opcionalmente R^d y R^e se pueden unir para formar un anillo ciclopropilo; y R^{k1} se selecciona del grupo que consiste en H, F, CN, OMe, metilo y etilo.

La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que tiene la fórmula (C):

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



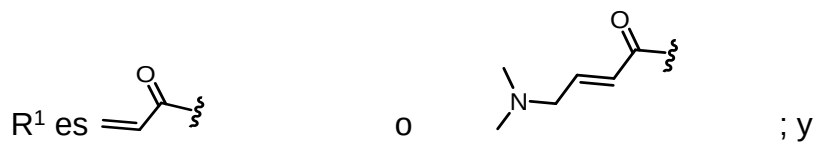
(C)

o una sal de este aceptable en términos farmacéuticos, donde:

X^1 y X^2 son ambos CH, o X^1 y X^2 son ambos N, o X^1 es N y X^2 es CH;

R^d y R^e se seleccionan cada uno de manera independiente del grupo que consiste en H y metilo;

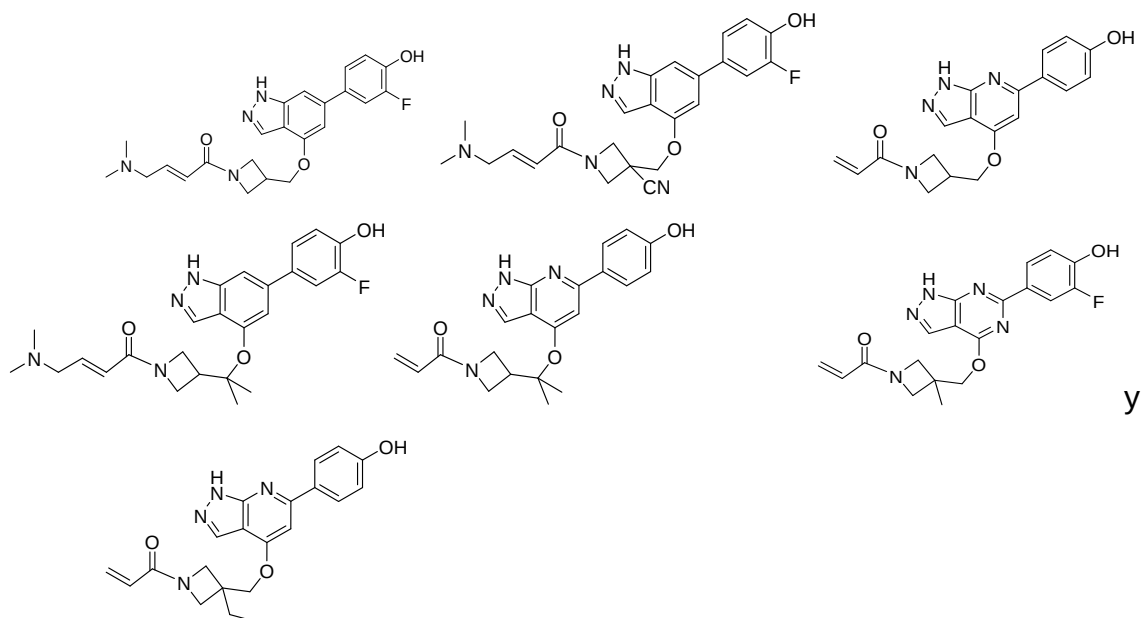
R^k se selecciona del grupo que consiste en H, CN, metilo y etilo;



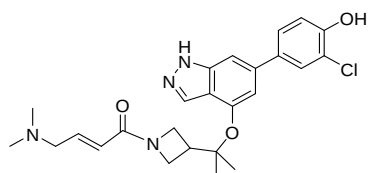
R^2 se selecciona del grupo que consiste en H, Cl y F.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

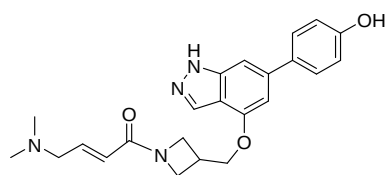
En algunas realizaciones, el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se selecciona del grupo que consta de:



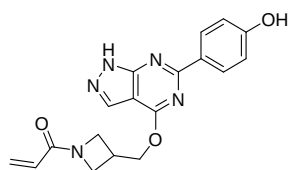
La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que tiene la fórmula:



La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que tiene la fórmula:



La invención también proporciona un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que tiene la fórmula:



P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una forma cristalina de este y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica además comprende uno o más otros agentes terapéuticos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico o varios otros agentes terapéuticos son útiles para tratar la enfermedad gastrointestinal inflamatoria, una enfermedad inflamatoria de la piel, una enfermedad inflamatoria de los pulmones o una enfermedad inflamatoria del ojo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico o varios otros agentes terapéuticos son útiles para tratar a la enfermedad gastrointestinal inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad gastrointestinal inflamatoria es la colitis ulcerosa. En algunas realizaciones, la enfermedad gastrointestinal inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

Además, algunos compuestos algunas veces pueden existir en formas tautómeras. 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 invención 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 aquí 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.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Esta invención también incluye compuestos de la divulgación etiquetados de forma isotópica, por ejemplo compuestos etiquetados de forma isotópica de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, compuesto 4, es decir, compuestos de la divulgación y compuestos de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, compuesto 4 en donde un átomo 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 los isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la divulgación y un compuesto de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, compuesto 4, incluyen, a mero título enunciativo, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S y ^{18}F . Son de particular interés los compuestos de la divulgación y compuestos de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, y compuesto 4, enriquecidos con tritio o carbono-14, qué compuestos se pueden usar, por ejemplo, en estudios de distribución de los tejidos. También son de particular interés los compuestos de la divulgación y compuestos de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, compuesto 4 enriquecido con deuterio en un lugar de metabolismo, compuestos que se espera que tengan una mayor estabilidad metabólica. Adicionalmente, son de particular interés los compuestos de la divulgación y compuestos de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3, compuesto 4, enriquecido con un isótopo emisor de positrones, tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , compuestos que se pueden usar, por ejemplo, en estudios de tomografía por emisión de positrones (PET).

Delimitaciones

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)

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

o (iPr), n-butilo (n-Bu) o (nBu), sec-butilo, isobutilo, terc-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.

El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo, como se definió arriba, que se sustituye por uno o más halógenos, p. ej., trifluorometilo, difluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropil, 1,2-dibromoetilo 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 de alquilo que tiene de 1 a 3 átomos de carbono en donde los átomos de carbono están en cualquier configuración químicamente aceptable, incluidas configuraciones lineales o ramificadas.

El término “alcoxi” significa el grupo –O-alquilo monovalente, en donde alquilo se define como se indicó anteriormente. Los grupos de alcoxi representativos incluyen, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y similares.

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 de cicloalquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, ciclopropilo (cPr), ciclobutilo, ciclopentil, ciclohexil, cicloheptil, ciclooctil, adamantil y similares.

El término “heterociclo”, “heterocíclico” o “anillo heterocíclico” significa un grupo cíclico no aromático saturado o parcialmente insaturado, que tiene de 3 a 10 átomos de anillo totales, en 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, espiros o enlazados). Cuando el grupo heterocíclico es multicíclico, al menos uno, pero no necesariamente todos los grupos cíclicos contienen un heteroátomo. Los grupos heterocíclicos

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

representativos incluyen, a modo 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, en 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 “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para el tratamiento cuando se administra a los pacientes que necesitan el tratamiento.

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

(a) prevenir que ocurra la enfermedad, el trastorno o la afección médica, es decir, prevenir la reaparición de la enfermedad o afección médica o tratamiento preventivo de un paciente que tiene predisposición a la enfermedad o afección médica;

(b) mejorar la enfermedad, el trastorno o la afección médica, es decir, eliminar o provocar la regresión de la enfermedad, del trastorno o de la afección médica en un paciente, e incluso contrarrestar los efectos de otros agentes terapéuticos;

(c) eliminar la enfermedad, el trastorno o la afección médica, es decir, ralentizar o detener el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección médica en un paciente; o

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

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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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), es decir una forma en donde uno o más grupos de 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.

El término “grupo protector de amino” significa un grupo protector idóneo para prevenir reacciones indeseadas en un nitrógeno amino. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, a mero título enunciativo, formilo; grupos de acilo, por ejemplo grupos de alcanoil, tal como acetilo y tri-fluoroacetilo; grupos de alcoxycarbonilo, tal como *terc*-butoxycarbonil (Boc); grupos de arilmetoxycarbonilo, tal como benziloxycarbonilo (Cbz) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc); grupos de arilmetilo, tal como bencilo (Bn), tritil (Tr), y 1,1-di-(4'-metoxifenil)metilo; grupos de sililo, tal como trimetilosilil (TMS), triisopropilsilil (TIPS), *terc*-butildimetilosilil (TBS o TBDMS), [2-(trimetilosilil)-etoxi]metilo (MEB); y similares. Numerosos grupos protectores, y su introducción y eliminación, se describen en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis [Grupos protectores en síntesis orgánica]*, Tercera edición, Wiley, Nueva York.

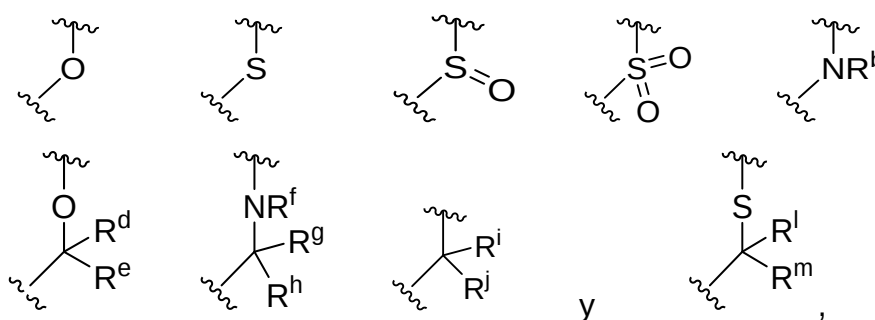
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Procedimientos generales de síntesis

Los compuestos de esta divulgación, y los productos intermedios de estos, se pueden preparar de acuerdo con los siguientes métodos y procedimientos generales usando materiales de partida y reactivos disponibles comercialmente o que se preparan de rutina. Los sustituyentes y las variables (p. ej., A, X¹, X², R¹, R², R³, R^a, R^b etc.) usados en los siguientes esquemas tienen los mismos significados que los definidos en otro lado de la presente, 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).

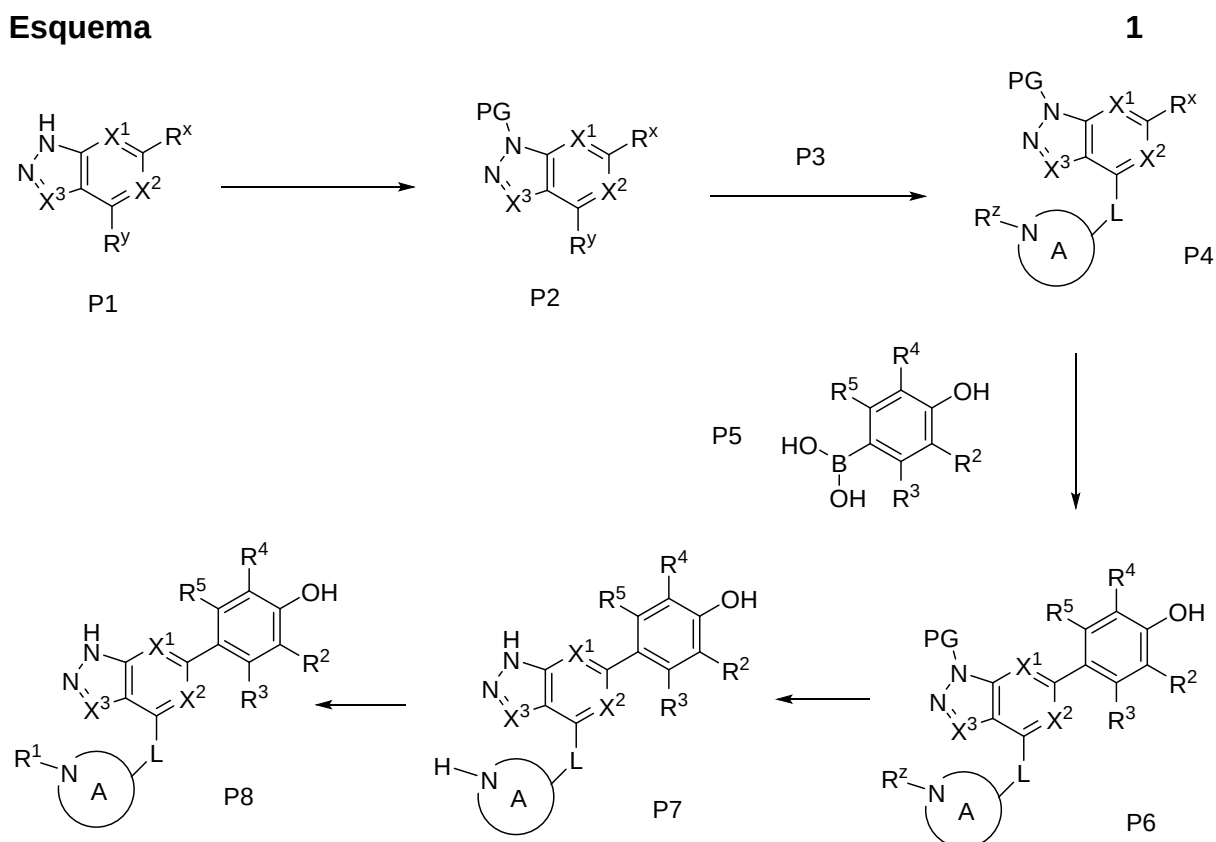
Aunque se puede mostrar o describir una realización particular de la presente invención en los siguientes procedimientos, los expertos en la técnica reconocerán que otras realizaciones o aspectos de la presente invención también se pueden preparar usando dichos procedimientos o usando otros métodos,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

Un método general de preparación de los compuestos finales de la divulgación en donde L se selecciona de:



se ilustra en el Esquema 1.

Esquema

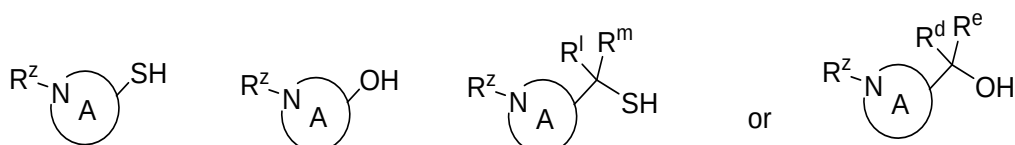


El material de partida P1, en donde R^x y R^y son halógenos que puede ser los mismos o diferentes, está protegido por un grupo PG protegido tal como tetrahidropirano para obtener P2. P2 luego se reactiva con P3 para obtener P4.

P3

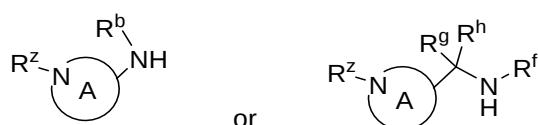
puede

ser:



en donde R^z es un segundo grupo de protección, por ejemplo Boc. En este caso, P3 se desprotona con una base tal como NaH y se reactiva con P2 para obtener P4.

De forma alternativa, P3 puede ser:

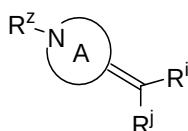


en donde R^z es un segundo grupo de protección, por ejemplo Boc. En este caso, P3 se reactiva con P2 en condiciones de acoplamiento de Buchwald tal

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

como en la presencia de Pd(0) y una base para obtener P4. De forma alternativa, P3 se reactiva con P2 en presencia de una base tal como DIPEA para obtener P4.

De forma alternativa, P3 puede ser:



en donde R^z es un segundo grupo de protección, por ejemplo Boc. En este caso, P3 se reactiva con P2 en presencia de Pd(0), 9-BBN y una base para formar P4.

P4 se acopla con el ácido borónico P5 (acoplamiento de Suzuki) en presencia de Pd(0) y una base para obtener P6. P6 se desprotege para obtener P7 (cuando PG es tetrahidropirano y R^z es Boc, la desprotección simultánea de los aminos ocurre en presencia de un ácido fuerte tal como TFA o HCl). Finalmente, P7 se convierte en una amida mediante el acoplamiento de amida (reacción con un ácido en presencia de un agente de acoplamiento tal como HATU o hidroxibenzotriazol [HOBT]) o reacción con un cloruro de acilo en presencia de una base tal como la base de Hunig.

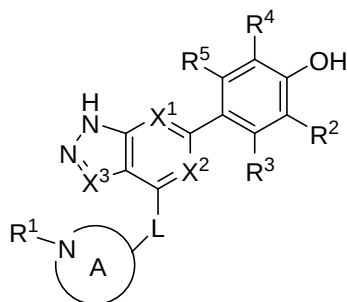
En este esquema de reacción, el orden de las reacciones se puede modificar. Por ejemplo, el acoplamiento de Suzuki se puede llevar a cabo antes de la introducción de la parte que contiene el anillo A. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando la parte que contiene el anillo A se introduce a través de un acoplamiento de Buchwald.

En este esquema de reacción, la protección de uno o los dos grupos de amino es opcional. Se puede usar el mismo esquema sintético sin la protección de amino para uno o dos de los grupos de amino que pueden proporcionar rendimientos más bajos.

El conector de sulfonilo se puede obtener al oxidar el sulfuro correspondiente, por ejemplo, con oxona y alúmina básica.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

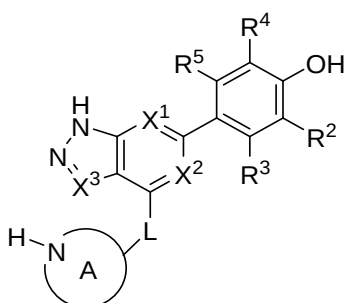
En consecuencia, en un aspecto del método, la invención proporciona un método para la preparación de un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este,



(I)

el método comprende:

la reacción de un compuesto de la fórmula (III):



(III)

con

- (i) Cl-R¹, o
- (ii) HO- R¹

en donde R¹, R², R³, R⁴, X¹, X², L y A son como se definieron arriba, y

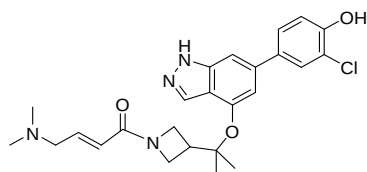
opcionalmente forma una sal farmacéuticamente aceptable para obtener un compuesto de fórmula (I) o una sal aceptable en términos farmacéuticos de este.

En aspectos separados y distintos, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (III) en donde las variables toman cualesquiera de los valores descritos anteriormente.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Formas cristalinas

En un aspecto, la invención proporciona una forma cristalina del compuesto de la fórmula:



Forma 1

La forma cristalina 1 de la invención es una forma libre cristalina de anhidro del compuesto 3. En un aspecto, la Forma 1 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, a 2θ valores de $5,65 \pm 0,20$; $14,22 \pm 0,20$; $15,16 \pm 0,20$; y $19,31 \pm 0,20$. La Forma 1 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a 2θ valores de $7,12 \pm 0,20$; $10,02 \pm 0,20$; $11,16 \pm 0,20$; $17,06 \pm 0,20$; y $24,43 \pm 0,20$. La Forma 1 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluidos tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a 2θ valores seleccionados de $13,10 \pm 0,20$; $14,82 \pm 0,20$; $16,55 \pm 0,20$; $20,08 \pm 0,20$; $21,08 \pm 0,20$; $21,65 \pm 0,20$; $22,51 \pm 0,20$; $22,98 \pm 0,20$; $25,02 \pm 0,20$; $25,72 \pm 0,20$; $26,80 \pm 0,20$; $27,06 \pm 0,20$; $28,31 \pm 0,20$; $30,08 \pm 0,20$; $30,31 \pm 0,20$; y $32,08 \pm 0,20$. La Forma 1 se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción 2θ valores seleccionados de $5,65 \pm 0,20$; $7,12 \pm 0,20$; $10,02 \pm 0,20$; $11,16 \pm 0,20$; $14,22 \pm 0,20$; $15,16 \pm 0,20$; $17,06 \pm 0,20$; $19,31 \pm 0,20$; y $24,43 \pm 0,20$.

Como se conoce bien en el campo de la difracción de radiografías en polvo, las posiciones del pico del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y geometría del instrumento, que son las alturas del pico relativas. Por lo tanto, en un aspecto, la forma cristalina 1 se caracteriza por un patrón de

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

difracción de radiografías en polvo en donde las posiciones del pico concuerdan sustancialmente con las que se muestran en la Figura 1.

En otro aspecto, la forma cristalina 1 se caracteriza por su comportamiento cuando se exponen a temperaturas altas. Como se demuestra en la Figura 2, el trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe un pico en el flujo térmico endotérmico, identificado como una transición de fusión, con un inicio a aproximadamente 154,9 °C y un pico a aproximadamente 162,9 °C. Después de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a aproximadamente 162,9 °C. La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a $162,9 \pm 3$ °C.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico a una temperatura entre aproximadamente 154,9 °C y aproximadamente 171 °C, o entre 158 °C y 167 °C.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 1 se muestra en la Figura 3. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) muestra una pequeña pérdida de peso de aproximadamente 0,14% a 100 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 175 °C.

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 1 se muestra en la Figura 4. La Forma 1 demostró aproximadamente un 1,62% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 1 se considera ligeramente higroscópica.

La Forma 1 se puede preparar al disolver el compuesto 3 como una forma amorfa en etanol, que después se agita a una temperatura de entre

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C y luego se realiza el filtrado y el secado para obtener la Forma 1. Opcionalmente, el sólido se puede lavar con etanol antes del secado.

La Forma 1 se puede preparar al añadir acetona al compuesto en una forma amorfa que se agita a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C y luego se realiza la adición de las moléculas iniciales. El lodo resultante se filtra y se seca para obtener la Forma 1.

Forma 2

La forma cristalina 2 de la invención es una forma libre cristalina de hidrato del compuesto 3. En un aspecto, la Forma 2 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, a 2θ valores de $6,90 \pm 0,20$; $9,15 \pm 0,20$; $10,00 \pm 0,20$; y $18,31 \pm 0,20$. La Forma 2 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a 2θ valores de $11,18 \pm 0,20$; $15,51 \pm 0,20$; y $20,90 \pm 0,20$. La Forma 2 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluidos tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a 2θ valores seleccionados de $12,76 \pm 0,20$; $13,33 \pm 0,20$; $13,82 \pm 0,20$; $14,43 \pm 0,20$; $16,04 \pm 0,20$; $17,00 \pm 0,20$; $17,90 \pm 0,20$; $22,06 \pm 0,20$; $22,51 \pm 0,20$; $25,00 \pm 0,20$; $26,92 \pm 0,20$; $27,26 \pm 0,20$; $27,61 \pm 0,20$; $29,37 \pm 0,20$; $30,53 \pm 0,20$; y $30,92 \pm 0,20$. La Forma 2 se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción 2θ valores seleccionados de; $6,90 \pm 0,20$; $9,15 \pm 0,20$; $10,00 \pm 0,20$; $11,18 \pm 0,20$; $15,51 \pm 0,20$; $18,31 \pm 0,20$; y $20,90 \pm 0,20$.

Como se conoce bien en el campo de la difracción de radiografías en polvo, las posiciones del pico del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y geometría del instrumento, que son las alturas del pico relativas. Por lo tanto, en un aspecto, la forma cristalina 2 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo en donde las posiciones del pico concuerdan sustancialmente con las que se muestran en la Figura 5.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

En otro aspecto, la forma cristalina 2 se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a temperaturas altas. Como se demostró en la Figura 6, el trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado con una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe una desolvatación endotérmica con un inicio a aproximadamente 52,7 °C y un pico a cerca de 84,4 °C y una fusión endotérmica con un inicio a cerca de 160,0 °C y un pico a aproximadamente 167,6 °C. Luego de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La Figura 7 muestra una traza representativa de TGA de la forma libre cristalina de la Forma 2 de la invención. El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 7 muestra una pérdida de peso de aproximadamente un 6,73% a 75 °C. El compuesto se desolvata a una temperatura inicial de aproximadamente 25 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 185 °C.

La Figura 8 se muestra una traza representativa de DMS de la forma libre cristalina de la Forma 2 de la invención. La Forma 2 se convierte en un hidrato (Forma 2b) a una HR superior al 65%. La deshidratación ocurre a una HR inferior al 15%. La absorción de humedad total a una HR entre el 5% y 90% es del 7,99%.

La Forma 2 se puede preparar al disolver el compuesto 3 en forma amorfa en metanol seguido de la adición de un antisolvente tal como agua, en una proporción de aproximadamente 1:2 metanol:agua. Opcionalmente, la mezcla se somete a sonicación. La mezcla luego se agita a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante alrededor de 12 a 24 horas. La Forma 2 luego se aísla mediante el filtrado y secado. Opcionalmente, el sólido se puede lavar con metanol.

La Forma 2 también se puede preparar mediante la disolución en etanol y agua o metanol y agua mediante la disolución completa en aproximadamente 10 volúmenes de alcohol seguida de una adición lenta de aproximadamente 8-10 volúmenes de agua hasta el punto de enturbiamiento. Las moléculas iniciales de la Forma 2 se agregan para formar un lodo lentamente con el paso del tiempo.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Se agrega lentamente más agua (aproximadamente 10 volúmenes) para proporcionar un sólido que se puede filtrar y secar para obtener la Forma 2.

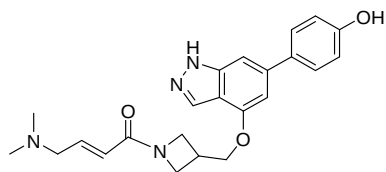
Forma 2b

La forma cristalina 2b de la invención es una forma libre cristalina deshidratada del compuesto 3. En un aspecto, la Forma 2b se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, a 2θ valores de $7,61 \pm 0,20$; $16,76 \pm 0,20$; $17,90 \pm 0,20$; y $20,67 \pm 0,20$. La Forma 2b además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a 2θ valores de $10,33 \pm 0,20$; $11,25 \pm 0,20$; $12,71 \pm 0,20$; $15,88 \pm 0,20$. La Forma 2b además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluidos tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a 2θ valores seleccionados de $13,23 \pm 0,20$; $13,66 \pm 0,20$; $13,90 \pm 0,20$; $15,02 \pm 0,20$; $15,27 \pm 0,20$; $16,33 \pm 0,20$; $18,26 \pm 0,20$; $21,37 \pm 0,20$; $21,92 \pm 0,20$; $22,31 \pm 0,20$; $22,90 \pm 0,20$; $23,22 \pm 0,20$; $23,61 \pm 0,20$; $24,74 \pm 0,20$; $25,78 \pm 0,20$; $26,23 \pm 0,20$; $26,73 \pm 0,20$; $27,57 \pm 0,20$; $29,10 \pm 0,20$; $29,39 \pm 0,20$; $30,72 \pm 0,20$; $30,94 \pm 0,20$; $31,69 \pm 0,20$; $32,06 \pm 0,20$; $33,76 \pm 0,20$; y $34,35 \pm 0,20$. La Forma 2b se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción 2θ valores seleccionados de $7,61 \pm 0,20$; $10,33 \pm 0,20$; $11,25 \pm 0,20$; $12,71 \pm 0,20$; $15,88 \pm 0,20$; $16,76 \pm 0,20$; $17,90 \pm 0,20$; y $20,67 \pm 0,20$.

Como se conoce bien en el campo de la difracción de radiografías en polvo, las posiciones del pico del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y geometría del instrumento, que son las alturas del pico relativas. Por lo tanto, en un aspecto, la forma cristalina 2b se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo en donde las posiciones del pico concuerdan sustancialmente con las que se muestran en la Figura 17.

En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina del compuesto de la fórmula:

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Forma 3

La forma cristalina 3 de la invención es una forma libre cristalina de anhidro del compuesto 1. En un aspecto, la Forma 3 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, a 2θ valores de $9,67 \pm 0,20$; $11,61 \pm 0,20$; $17,61 \pm 0,20$; $18,88 \pm 0,20$; y $23,33 \pm 0,20$. La Forma 3 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a 2θ valores de $4,82 \pm 0,20$; $15,69 \pm 0,20$; y $16,19 \pm 0,20$. La Forma 3 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluidos tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a 2θ valores seleccionados de $11,92 \pm 0,20$; $12,98 \pm 0,20$; $13,23 \pm 0,20$; $16,45 \pm 0,20$; $16,67 \pm 0,20$; $19,39 \pm 0,20$; $19,96 \pm 0,20$; $20,14 \pm 0,20$; $22,14 \pm 0,20$; $23,84 \pm 0,20$; $24,06 \pm 0,20$; $24,29 \pm 0,20$; $25,31 \pm 0,20$; $25,63 \pm 0,20$; $27,06 \pm 0,20$; $27,31 \pm 0,20$; $30,10 \pm 0,20$; y $30,53 \pm 0,20$. La Forma 3 se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción 2θ valores seleccionados de $4,82 \pm 0,20$; $9,67 \pm 0,20$; $11,61 \pm 0,20$; $15,69 \pm 0,20$; $16,19 \pm 0,20$; $17,61 \pm 0,20$; $18,88 \pm 0,20$; y $23,33 \pm 0,20$.

Como se conoce bien en el campo de la difracción de radiografías en polvo, las posiciones del pico del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y geometría del instrumento, que son las alturas del pico relativas. Por lo tanto, en un aspecto, la forma cristalina 3 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo en donde las posiciones del pico concuerdan sustancialmente con las que se muestran en la Figura 9.

En otro aspecto, la forma cristalina 3 se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a temperaturas altas. Como se demuestra

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

en la Figura 10, el trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe un pico en el flujo térmico endotérmico, identificado como una transición de fusión, con un inicio a aproximadamente 197,7 °C y un pico a aproximadamente 201,3 °C. Después de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a 201,3 °C $\pm$ 2 °C.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico a una temperatura entre 198 °C y 204 °C.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 3 de la invención se muestra en la Figura 11. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Figura 11 no muestra una pérdida significativa de peso a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 195 °C.

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 3 de la invención se muestra en la Figura 12. La Forma 3 demostró aproximadamente un 0,33% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 3 se considera no higroscópica.

La Forma 3 se puede preparar al suspender el compuesto 1 en una forma amorfa en una mezcla 1:1 de acetonitrilo e isopropanol. La suspensión resultante se agita durante aproximadamente 1 día a alrededor de 50 °C, se filtra, opcionalmente se lava con una mezcla 1:1 de acetonitrilo e isopropanol y se seca durante un par de horas para obtener la Forma 3.

La Forma 3 se puede preparar al disolver el compuesto 1 como una base libre amorfa en IPA a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C. Se agrega una cantidad igual de acetonitrilo. Se puede agregar más compuesto hasta que se forme la solución saturada. Se agregan

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

las moléculas iniciales y se agita la mezcla durante la noche. El lodo blanco formado que se desarrolla se filtra y seca para obtener la Forma 3.

Forma 4

La forma cristalina 4 de la invención es una forma libre cristalina de hidrato del compuesto 1. En un aspecto, la Forma 4 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, a 2θ valores de $6,26 \pm 0,20$, $16,55 \pm 0,20$; $16,94 \pm 0,20$; $18,33 \pm 0,20$; $23,61 \pm 0,20$; y $24,24 \pm 0,20$. La Forma 4 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene picos de difracción adicionales a 2θ valores de $11,86 \pm 0,20$; $12,51 \pm 0,20$; $13,16 \pm 0,20$; y $14,98 \pm 0,20$. La Forma 4 además se puede caracterizar por un patrón de PXRD que tiene dos o más picos de difracción adicionales, incluidos tres o más y cuatro o más picos de difracción adicionales a 2θ valores seleccionados de $17,61 \pm 0,20$; $18,78 \pm 0,20$; $19,39 \pm 0,20$; $19,57 \pm 0,20$; $19,84 \pm 0,20$; $21,45 \pm 0,20$; $21,82 \pm 0,20$; $22,57 \pm 0,20$; $24,67 \pm 0,20$; $25,10 \pm 0,20$; $25,39 \pm 0,20$; $27,19 \pm 0,20$; $27,39 \pm 0,20$; $28,55 \pm 0,20$; y $31,51 \pm 0,20$. La Forma 4 se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene tres, cuatro, cinco o seis picos de difracción 2θ valores seleccionados de $6,26 \pm 0,20$, $11,86 \pm 0,20$; $12,51 \pm 0,20$; $13,16 \pm 0,20$; $14,98 \pm 0,20$; $16,55 \pm 0,20$; $16,94 \pm 0,20$; $18,33 \pm 0,20$; $23,61 \pm 0,20$; y $24,24 \pm 0,20$.

Como se conoce bien en el campo de la difracción de radiografías en polvo, las posiciones del pico del patrón de PXRD son relativamente menos sensibles a los detalles experimentales, tales como detalles de la preparación de la muestra y geometría del instrumento, que son las alturas del pico relativas. Por lo tanto, en un aspecto, la forma cristalina 4 se caracteriza por un patrón de difracción de radiografías en polvo en donde las posiciones del pico concuerdan sustancialmente con las que se muestran en la Figura 13.

En otro aspecto, la forma cristalina 4 se caracteriza por su comportamiento cuando se expone a temperaturas altas. Como se demostró en la Figura 14, el trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado con una tasa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto exhibe una desolvatación

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

endotérmica con un inicio de aproximadamente 60,9 °C y un pico a aproximadamente 103,6 °C y una fusión endotérmica caracterizada por un inicio a aproximadamente 167,3 °C. El compuesto se descompone en la fusión. La fusión endotérmica y la descomposición exotérmica se superponen.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 4 de la invención se muestra en la Figura 15. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Figura 15 muestra una pérdida de peso de aproximadamente 3,54% a 100 °C. El compuesto se desolvata en la temperatura inicial de aproximadamente 50 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 165 °C.

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 4 de la invención se muestra en la Figura 16. La Forma 4 demostró aproximadamente un 5,01% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 4 se considera moderadamente higroscópica.

La Forma 4 se puede preparar al suspender el compuesto 1 en agua. La suspensión resultante se agita durante aproximadamente 1 a 2 días a aproximadamente 50 °C, se filtra, opcionalmente se lava con agua y se seca a una temperatura de entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante alrededor de 2 a 6 horas para obtener la Forma 4.

De manera alternativa, la Forma 4 también se puede preparar al disolver el compuesto 1 en etanol y agua o metanol y agua mediante la disolución completa en aproximadamente 10 volúmenes de alcohol seguida de una adición lenta de aproximadamente 8-10 volúmenes de agua hasta el punto de enturbiamiento. Las moléculas iniciales de la Forma 4 se agregan y un lodo resultante se desarrolla lentamente con el paso del tiempo. Luego, se agrega lentamente más agua (aproximadamente 10 volúmenes) y el sólido se filtra y se seca para obtener la Forma 4.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la divulgación 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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

administrar a un paciente mediante cualquier vía de administración aceptable que incluye, a mero título enunciativo, modos de administración oral, tópica (incluida transdérmica), rectal, nasal, inhalada y parenteral.

En consecuencia, en uno de sus aspectos de composición, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente y un compuesto de la fórmula (I), (II), (B), (C), compuesto 1, compuesto 3 o compuesto 4 o una sal farmacéuticamente aceptable de estos. 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” o “compuesto de la divulgación” también se puede referir aquí como el “agente activo”. Como se usa en la presente, el término “compuestos de la divulgación” tiene como fin incluir los compuestos abarcados por la fórmula (I), (II), (B), (C), (Ia), (IIa), (Ib), (IIb), (Ic), (IIc), (Id), (IId), (Ie), (IIe), (If), (IIIf), (IIIf), (IVf), (Vf), (VIIf), (VIIIf) y (VIIIIf), y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación en general contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación. 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 0,1% a aproximadamente 95% de peso del agente activo; incluido de aproximadamente 5% a aproximadamente 70% de 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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se empaquetan preferentemente en una forma posológica de dosis. El término “forma posológica de dosis” significa una unidad físicamente diferenciada para administrar la dosis a un paciente, es decir, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de un agente activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado, ya sea solo o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas posológicas de dosis pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares o paquetes de unidades adecuados para la administración parenteral.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la divulgación son adecuadas para la 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 divulgación como ingrediente activo.

Cuando se tiene prevista la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de la divulgación en general comprenderán el agente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, dichas formas de dosificación sólidas también comprenden: rellenos o diluyentes, tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, fosfato dicálcico, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; ligantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, pirrolidona polivinílica, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes desintegrantes, tales como croscarmelosa de sodio, agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y/o carbonato de sodio; agentes retardadores de solución, tales como parafina; aceleradores de absorción, tal como amonio cuaternario; agentes de humectación, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerina; absorbentes, tales como caolín y/o arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

magnesio, polietilenglicol sólidos, lauril sulfato de sodio y/o mezclas de estos; agentes colorantes; y tampones.

Los agentes de liberación, los agentes de humectación, los agentes de recubrimiento, endulzantes, saborizantes y agentes aromatizantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato propilo, alfa-tocoferol y similares; y quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. Los agentes de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares incluyen aquellos usados para recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de metilcelulosa de hidroxipropilo, copolímeros de éster de ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa, etilcelulosa de carboximetilo, succinato de acetato de metilcelulosa de hidroxipropilo y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, metilcelulosa hidroxipropilo en la variación de proporciones u otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden contener, de manera opcional, agentes opacificadores y se pueden formular de manera que liberen solamente el ingrediente activo, o preferentemente, en una parte determinada del tubo digestivo, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de las composiciones de imbibición que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede ser en forma microencapsulada, si corresponde, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Las formas de dosificación líquida adecuadas para la administración oral incluyen, a modo de ejemplo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquida en general comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizadores y emulsificadores, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato bencílico, glicol propileno, glicol 1,3-butileno, aceites (p. ej., aceites de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), ácido oleico glicerol, alcohol tetrahidrofurilo, polietilenglicol y éster ácido graso de sorbitán y mezclas de estos. De manera alternativa, determinadas formulaciones líquidas se pueden convertir, por ejemplo, al secarlas por atomización, en polvo, que se usa para preparar formas posológicas sólidas mediante procedimientos convencionales.

Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isostearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, así como también mezclas de estas.

Los compuestos de esta divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, también se pueden administrar por vía parenteral (p. ej. inyecciones intravenosas, subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales). Para la administración parenteral, el agente activo en general se mezcla con un vehículo adecuado para la administración parenteral, incluido, a modo de ejemplo, soluciones acuosas estériles, solución salina, alcoholes de peso molecular bajo tal como propileno glicol, polietilenglicol, aceites vegetales, gelatina, ésteres de ácido graso, tales como oleato de etilo y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más antioxidantes, solubilizantes, estabilizadores, conservantes, agentes de humectación, emulsionantes, tampones o agentes dispersantes. Estas formulaciones se pueden considerar estériles mediante el uso de un medio estéril inyectable, un agente de esterilización, filtrado, irradiación o calor.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se formulan para la administración mediante la inhalación. Las composiciones farmacéuticas idóneas para la administración mediante la inhalación en general serán de la forma de aerosol o un polvo. Dichas composiciones en general se administran usando dispositivos de administración bien conocidos, tales como un inhalador de dosis medidas, un inhalador de polvo seco, un nebulizador o un dispositivo de administración similar.

Cuando se administra mediante inhalación usando un envase presurizado, las composiciones farmacéuticas de la divulgación en general comprenden el ingrediente activo y un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Además, la composición farmacéutica puede estar en forma de cápsula o cartucho (por ejemplo, fabricado a partir de gelatina) que comprende un compuesto de la divulgación y un polvo adecuado para usar en un inhalador de polvo. Las bases de polvo adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, lactosa o almidón.

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, también se pueden formular para la administración tópica en la piel como un ungüento o crema. Las formulaciones de ungüentos son preparaciones semisólidas que tienen una base de un material aceitoso o grasoso que en general es transparente. Los materiales aceitosos adecuados para usar en las formulaciones de ungüentos incluyen petrolato (gelatina de petróleo), cera de abejas, manteca de cacao, manteca de karité y alcohol cetílico. Opcionalmente, los ungüentos pueden incluir, además, emolientes y reforzadores de la penetración, si así se desea.

Las formulaciones de crema se pueden preparar como emulsiones que comprenden una fase oleosa y una fase acuosa, en general, incluye agua purificada. Los componentes de las formulaciones de crema pueden incluir: bases de aceite, tales como petrolato, aceites minerales, aceites vegetales y animales y triglicéridos; bases de crema, tales como alcoholes de lanolina, ácido esteárico y alcohol cetoestearílico; una base de gel, tal como alcohol de polivinilo;

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

solventes, tales como, propileno glicol y polietilenglicol; emulsionantes, tales como polisorbatos, estearatos, tales como gliceril estearato, octilhidroxiestearato, polioxil estearato, PEG estearil éteres, palmitato de isopropilo y monoestearato de sorbitán; estabilizadores, tales como polisacáridos y sulfito de sodio; emolientes (es decir, humectantes), tales como triglicéridos de cadena media, miristato de isopropilo y dimeticona; agentes espesantes, tales como alcohol cetílico y alcohol estearílico; agentes antimicrobianos, tales como metilparabeno, propilparabeno, fenoxietanol, ácido sórbico, diazolidinil urea y hidroxianisol butilado; reforzadores de la penetración, tales como *N*-metilpirrolidona, propileno glicol, monolaurato de polietileno glicol y similares; y quelantes, tal como edetato disódico.

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

Forma posológica sólida de comprimido oral

Un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de estos se mezcla en seco con celulosa microcristalina, pirrolidona polivinílica y croscarmelosa de sodio en una proporción de 4:5:1:1 y se comprime en comprimidos para proporcionar una dosificación unitaria de, por ejemplo, 5 mg, 20 mg o 40 mg del agente activo por comprimido.

Forma posológica sólida de cápsula oral

Un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de estos se combina con celulosa microcristalina, pirrolidona polivinílica y croscarmelosa de sodio en una proporción de 4:5:1:1 mediante granulación húmeda y se carga en cápsulas de gelatina o hidroxipropil metilcelulosa para proporcionar una dosificación unitaria de, por ejemplo, 5 mg, 20 mg o 40 mg del agente activo por cápsula.

Formulación líquida

Una formulación líquida que comprende un compuesto de la divulgación (0,1%), agua (98,9%) y ácido ascórbico (1,0%) se forma al agregar un compuesto de la divulgación a una mezcla de agua y ácido ascórbico.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Forma posológica oral recubierta entérica

Un compuesto de la divulgación se disuelve en una solución acuosa que contiene pirrolidona polivinílica y recubierta mediante pulverización en celulosa microcristalina o granulados de azúcar en una proporción de 1:5 p/p de agente activo:granulados y luego un aumento de peso de aproximadamente el 5% de un recubrimiento entérico que comprende un copolímero de acrílico, por ejemplo, una combinación de copolímero de acrílico disponibles bajo las marcas registradas Eudragit-L® y Eudragit-S®, o se aplica succinato de acetato de hidroxipropil metilcelulosa. Los granulados recubiertos entéricos se cargan en cápsulas de gelatina o hidroxipropil metilcelulosa para proporcionar una dosificación unitaria de, por ejemplo, 30 mg de agente activo por cápsula.

Forma posológica oral recubierta entérica

Un recubrimiento entérico que comprende una combinación de Eudragit-L® y Eudragit-S®, o se aplica succinato de acetato de hidroxipropil metilcelulosa a una forma posológica oral de comprimidos o una forma posológica oral de cápsulas descritas anteriormente.

Formulación de ungüento para la administración tópica

Un compuesto de la divulgación se combina con petrolato, triglicéridos C₈-C₁₀, octilhidroxistearato y N-metilpirrolidona en una proporción para proporcionar una composición que contiene del 0,05% al 5% del agente activo por peso.

Formulación de ungüento para la administración tópica

Un compuesto de la divulgación se combina con petrolato blanco, propilenglicol, monoglicéridos y diglicéridos, parafina, hidroxitolueno butilado y edetato disódico de calcio en una proporción para proporcionar una composición que contiene del 0,05% al 5% del agente activo por peso.

Formulación de ungüento para la administración tópica

Un compuesto de la divulgación se combina con un aceite mineral, parafina, carbonato de propileno, petrolato blanco y cera blanca para proporcionar una composición que contiene del 0,05% al 5% del agente activo por peso.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Formulación de crema para la administración tópica

El aceite mineral se combina con un compuesto de la divulgación, propilenglicol, palmitato de isopropilo, polisorbato 60, alcohol cetílico, monoestearato de sorbitán, polioxil 40 estearato, ácido sórbico, metilparabeno y propilparabeno para formar una fase de aceite, que se combina con agua purificada mediante una mezcla de cizallamiento para proporcionar una composición que contiene del 0,05% al 5% del agente activo por peso.

Formulación de crema para la administración tópica

Una formulación de crema que comprende un compuesto de la divulgación, alcohol bencílico, alcohol cetílico, ácido cítrico anhidro, monoglicéridos y diglicéridos, alcohol oleil, propilenglicol, cetostearil sulfato de sodio, hidróxido de sodio, alcohol estearílico, triglicéridos y agua contiene del 0,05% al 5% del agente activo por peso.

Formulación de crema para la administración tópica

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

Utilidad

La inhibición de la JAK3 bloquea la señalización de muchas citocinas proinflamatorias clave. Por lo tanto, se espera que los compuestos de la divulgación sean útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

Los compuestos de la divulgación se han diseñado para que sean selectivos para JAK3 por encima de JAK1, JAK2 y TYK2. Se prevé que la selectividad para JAK3 por encima de JAK1 sea beneficiosa ya que hay algo de evidencia de que la selectividad de JAK3 permite la conservación de citocinas posiblemente beneficiosas, tales como IL-10, que estuvo involucrada en la sanación de la mucosa, IL-22 que cumple una función en la protección de la barrera del moco y la regeneración epitelial e IL-6 que tiene un rol en la

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

proliferación de las células epiteliales intestinales. La selectividad para JAK3 por encima JAK2 permite la conservación de la señalización de eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO).

Sin que se limiten por esta teoría, los compuestos de la divulgación poseen una parte electrofílica que puede formar un enlace covalente con la cisteína (Cys909) presente en la JAK3, un residuo reemplazado por una serina en las otras tres isoformas de la JAK (Goedken *et al.*, *J Biol Chem.*, **2015**, 290, 8, 4573-89). Dicha unión covalente a la JAK3 puede ser beneficioso, ya que proporciona una interacción extendida con el objetivo que se puede traducir en una mejor eficacia. Como se describe en la parte experimental, las estructuras de cocrystal de los compuestos 1, 3 y 4 enlazados de manera covalente a la JAK3 humana se han obtenido, lo que confirma la naturaleza enlazante irreversible para cada uno de estos ligandos a la JAK3.

Algunos compuestos de la divulgación se han diseñado para que tengan sus efectos en el lugar de acción sin efectos sistémicos significativos, de modo que se evitan los posibles efectos adversos inmunosupresores sistémicos.

Enfermedad gastrointestinal inflamatoria

Además de proporcionar una inhibición potente de la JAK3, algunos compuestos de la divulgación se han diseñado para tener una absorción deficiente y minimizar la exposición sistémica. Estos compuestos están diseñados para que tengan su efecto en el lugar de acción, por ejemplo, en el colon. Como se describe en el Ensayo 6, determinados compuestos exhiben permeabilidades bajas con valores de K_p menores que aproximadamente 5×10^{-6} cm/seg, lo que se considera favorable para minimizar la exposición sistémica y dirigirse al colon. Determinados compuestos tienen un valor de K_p menor que aproximadamente 10×10^{-6} cm/seg, lo que puede también ser suficiente para minimizar la exposición sistémica y dirigirse al colon. Como se describe en el Ensayo 7 a continuación, los compuestos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 21 y 22 exhibieron una proporción de exposición en el colon respecto de la exposición en el plasma en la administración oral mayor que aproximadamente 1250. Los compuestos 9, 5, 19

y 20 exhibieron una relación entre colon y plasma superior a aproximadamente 200.

La colitis inducida por oxazolona es un modelo experimental que tiene una similitud histológica con la colitis ulcerosa humana. Como se describe en el Ensayo 8, los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 3-11, 5-10, 19, 15-1, 3-55, 3-34, 15-3, 21, 3-80, 3-81, 3-72, 3-57, 3-113 y 3-74 demostraron actividad en el modelo de colitis inducida por oxazolona en ratones. Además, cuando se evaluó en el Ensayo 9, un modelo de inmunosupresión en ratones, que evalúa la actividad sistémica funcional, los recuentos de las células de NK esplénicas no se vieron afectados por los compuestos 1, 2, 4, 5 y 8 en dosis iguales o superiores requeridas para demostrar la eficacia en el modelo de oxazolona.

Finalmente, se demostró que los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 carecían de actividad sistémica en un modelo murino de la inducción de pSTAT5 inducida por IL-2 en el timo.

Por lo tanto, estos compuestos demostraron una actividad anticolítica sin exhibir efectos sistémicos en los modelos preclínicos.

Se prevé que una proporción superior de colon respecto del plasma proporcione una actividad anti inflamatoria sólida impulsada por el contacto sin efectos adversos sistémicos asociados. Dichos compuestos 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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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 el inhibidor de puntos de control inmunitario (p. ej., colitis inducida por el inhibidor de CTLA-4; (Yano *et al.*, *J Translation Med*, **2014**, 12, 191), 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 la elevación de determinados niveles de 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 invención 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 un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

La invención da a conocer además un método para tratar la colitis ulcerosa en un mamífero, el método que comprende la administración al mamífero 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 estos.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Cuando se usan para tratar la colitis ulcerosa, los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos en general se administrarán por vía oral 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.

Se prevé que las dosis idóneas para tratar la colitis ulcerosa y otros trastornos gastrointestinales inflamatorios varíen de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 mg/día del agente activo, incluso de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg/día y de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 mg por día del agente activo para un promedio de un humano de 70 kg.

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 lograr el tratamiento de los trastornos gastrointestinal inflamatorios. Los diferentes agentes pueden administrarse de forma secuencial o simultánea (en composiciones separadas o en la misma composición). Las clases útiles de agentes para tratamiento de combinación que incluyen, a mero título enunciativo, aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, anticuerpos anti-TNF α , inhibidores del ligando del TNF alfa, agente enlazante del TNF, anticuerpos anti-VLA-4, anticuerpos anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, agentes antibacterianos, agonistas de glucocorticoides, inhibidores del factor nuclear kappa B, inhibidores de 5-lipoxigenasa, antagonistas de integrina alfa-4/beta-7, inhibidores del ciclooxigenasa, antagonistas de IL-23, antagonistas del receptor de leucotrienos BLT, antagonistas de IL-6, antagonistas de IL-8, antagonistas de integrina, agonistas del receptor nicotínico por acetilcolina, agonistas de PPAR gama,

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

moduladores del receptor 1 de esfingosina-1-fosfato, inhibidores del CD20 del antígeno del linfocito B, inhibidores de calcineurina, antagonistas de CD3, inhibidores de la molécula de adhesión celular, inhibidores de peroxidasa eosinofílica, agonistas de la heparina, inhibidores del gen ICAM1, antagonistas de IL-13, inhibidores de la subunidad del receptor alfa de IL-2, sensibilizantes de insulina, ligandos de interferón beta, antagonistas del receptor de interferón gama, moduladores del ligando interleucina-1 beta, inhibidores de MAdCAM, inhibidores de PDE 4, agonistas de receptor 1 de esfingosina-1-fosfato, agonistas de TLR-9, inhibidores de acetilcolinesterasa, agonistas del receptor ACTH, antagonistas del receptor de activina, antagonistas de la quimiocina CCR5, antagonistas de la quimiocina CCR9 y medicamentos antidiarreicos.

Los aminosalicilatos que se pueden usar con los compuestos actuales del inhibidor de la JAK incluyen, a mero título enunciativo, mesalamina, osalazina y sulfasalazina. Los ejemplos de esteroides incluyen, a mero título enunciativo, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, budesonida, beclometasona y fluticasona. Los inmunosupresores sistémicos útiles para el tratamiento de los trastornos inflamatorios incluyen, a mero título enunciativo ciclosporina, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina y tacrolimus. Además, los anticuerpos anti-TNF α , que incluyen, a mero título enunciativo, infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab, se pueden usar en el tratamiento de combinación. Los compuestos útiles que funcionan mediante otros mecanismos incluyen anticuerpos anti-VLA-4, tal como natalizumab, anticuerpos anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, tal como vedolizumab, agentes antibacterianos, tal como rifaximina y medicamentos antidiarreicos, tal como loperamida. (Mozaffari *et al. Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, 14, 583-600; Danese, *Gut*, **2012**, 61, 918-932; Lam *et al., Immunotherapy*, **2014**, 6, 963-971.)

Otros compuestos que se pueden usar con los compuestos actuales del inhibidor de la JAK incluyen, a mero título enunciativo opaganib, abatacept, mongersen, filgotinib, LYC-30937, BI-655130, mirikizumab, adalimumab, tacrolimus, rituximab, GSK-2982772, andecaliximab, naltrexona, risankizumab, QBECO, alicaforsen, etrolizumab, foralumab, ocrelizumab, vedolizumab,

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

amiselimod, ozanimod, dolcanatida, catridecacog, budesónida, STNM-01, cannabidiol, telotristat etiprato, SHP-647, carotegrast metilo, peg-ilodecacina, TOP-1288, iberogast N, PF-06480605, peficitinib, beclometasona, interferón beta-1a recombinante, infliximab, golimumab, tralokinumab, ustekinumab, certolizumab pegol, talidomida, upadacitinib, apremilast, natalizumab, interferón beta-1a, rifaximin, RBX-2660, etrasimod, zileuton, fingolimod, cobitolimod, ropivacaína, ABX-464, PF-06700841, prednisolona, GLPG-0974, valganciclovir, ciclosporina, VB-201, tulinercept, MDGN-002, PTG-100, dexametasona, GED-0507-34-Levo, bertilimumab, brazikumab, KHK-4083, rosiglitazona, mocravimod, sotrastaurin, KAG-308, PUR-0110, E-6007, balsalazida, basiliximab, LP-02, ASP-3291, Trichuris suis ova, K(D)PT, midismasa, DNVX-078, vatelizumab, alequel, heparina de peso molecular bajo, metencefalina, tridecactida, HMPL-004, SB-012, olsalazina, propionil-L-carnitina, Clostridium butyricum, y acemanano.

En otro aspecto, por lo tanto, la invención proporciona una combinación terapéutica para usar en el tratamiento de trastornos gastrointestinales inflamatorios, la combinación comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más otros agentes terapéuticos útiles para tratar trastornos gastrointestinales inflamatorios, tal como los que se ilustran arriba. Por ejemplo, la invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más agentes seleccionados de aminosalicilatos, esteroides, inmunosupresores sistémicos, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-VLA-4, anticuerpos anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, agentes antibacterianos y medicamentos antidiarreicos. Los agentes secundarios, cuando se incluyen, se presentan en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir en cualquier cantidad que produzca un efecto terapéuticamente benéfico cuando se coadministra con un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Por lo tanto, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, y uno o más otros agentes terapéuticos útiles para tratar trastornos gastrointestinales inflamatorios.

Además, en un aspecto del método, la invención proporciona un método para tratar trastornos gastrointestinales inflamatorios, el método que comprende la administración al mamífero de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, y uno o más otros agentes terapéuticos útiles para tratar trastornos gastrointestinales inflamatorios.

Cuando se usa en el tratamiento de combinación, los agentes se pueden formular en una única composición farmacéutica, como se divulga arriba, 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. Cuando se administran de forma separada, los agentes se administran lo suficientemente cerca en el tiempo para así proporcionar un efecto terapéutico deseado. 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.

Enfermedad cutánea inflamatoria

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 lo tanto, los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, pueden ser beneficiosos en varias afecciones inflamatorias dérmicas o pruríticas que incluyen, a mero título enunciativo, la dermatitis atópica, la alopecia areata, el vitiligo, la psoriasis, la dermatomiositis, el linfoma cutáneo de linfocitos T (Netchiporouk *et al.*, *Cell Cycle*. **2014**; 13, 3331-3335) y subtipos (síndrome de Sezary, micosis fungoide, reticulosis pagetoide, piel flácida granulomatosa, papulosis linfomatoide, pitiriasis liquenoide crónica, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, linfoma cutáneo de células T CD30+, linfoma de células grandes CD30+ secundario cutáneo, linfoma cutáneo de células T grandes

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

CD30– micosis no fungoide, linfoma de células T pleomórficas, linfoma de Lennert, linfoma subcutáneo de células T, linfoma angiocéntrico, linfoma NK blástico), prurigo nodularis, liquen plano, amiloidosis cutánea localizada primaria, penfigoide ampollar, 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 folliculitis 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), 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), amiloidosis cutánea localizada primaria (Tanaka *et al.*, *Br J Dermatol.* **2009**, 161, 1217-1224), penfigoide ampollar (Feliciani *et al.*, *Int J Immunopathol Pharmacol.* **1999**, 12, 55-61) y 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, o una forma cristalina 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, o una forma cristalina de estos, sean útiles para el tratamiento de la dermatitis atópica y otras enfermedades cutáneas inflamatorias.

En un aspecto, por lo tanto, la invención 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 estos, o una forma cristalina de estos, y un portador farmacéutico en la piel del mamífero. En un aspecto, la enfermedad cutánea inflamatoria es dermatitis atópica.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos útiles para tratar las enfermedades cutáneas inflamatorias. En algunas realizaciones, uno o más compuestos son un esteroide, un antagonista del receptor de histamina H1, un inhibidor de calcineurina, antagonista del IL-13, un inhibidor de PDE 4, antagonista -44 del receptor acoplado a proteína G, un antagonista del IL-4, un antagonista del receptor de 5-HT 1a, un antagonista del receptor de 5-HT 2b, un agonista de adrenoceptor Alfa 2, un antagonista del receptor cannabinoide CB1, un antagonista de quimiocina CCR3, inhibidor de collagenasa, un inhibidor de fosfolipasa citosólica A2, un inhibidor del ligando de eotaxina, un inhibidor del factor de transcripción de GATA 3, un antagonista del receptor de histamina H4, un antagonista del IL-10, un antagonista del IL-12, un antagonista del IL-17, un antagonista del IL-2, un antagonista del modulador del receptor de IL-23, IL-4, un antagonista del IL-5, un antagonista de la inmunoglobulina E, un modulador de la inmunoglobulina E, un antagonista del receptor de interferón gama, un inhibidor del ligando de interleucina 33, un antagonista del receptor de interleucina 31, un antagonista del leucotrieno, un agonista del receptor hepático X, un agonista del receptor hepático X beta, un inhibidor del factor nuclear kappa B, un antagonista del receptor de OX-40, un antagonista del PGD2, un inhibidor de fosfolipasa A2, un estimulador de la fosfata de inositol 1 del dominio SH2 1, un inhibidor del ligando linfoproteínico estromal tímico, un modulador de TLR, un modulador del ligando del TNF alfa o un antagonista del vanilloide VR1. En algunas realizaciones, uno o más compuestos son un antibiótico grampositivo, tal como mupirocina o ácido fusídico. En algunas realizaciones, uno o más compuesto son tranilast, tacrolimus, epinastina, SB-011, AM-1030, ZPL-521, MM-36, FB-825, PG-102, viromed, GBR-830, AVX-001, AMG-0101, E-6005, DMT-210, AX-1602, bertilimumab, acetato de rosiptor, Q-301, ANB-020, VTP-38543, ZPL-389, lebrikizumab, tezepelumab, fexofenadina, pimecrolimus, bepotastina, crisaborol, tralokinumab, fevipiprant, doxiciclina, desloratadina,

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

ALX-101, nemolizumab, asivatrep, ciclosporina, mepolizumab, dupilumab, secukinumab, timapirant o ustekinumab.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad cutánea inflamatoria en un mamífero, el método comprende la aplicación de un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, y un antibiótico grampositivo en la piel del mamífero. En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, un antibiótico grampositivo y un portador farmacéuticamente aceptable.

Enfermedades respiratorias

Las citocinas que señalizan a través de la vía de la JAK-STAT, en particular IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), el interferón- γ (IFN γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) también estuvieron implicados en la inflamación del asma y en otras enfermedades respiratorias inflamatorias. Como se describió anteriormente, los compuestos de la divulgación han demostrado ser inhibidores potentes de la JAK3 y también han demostrado una inhibición potente de las citocinas proinflamatorias IL-2 en ensayos celulares.

La actividad antiinflamatoria de los inhibidores de la JAK se ha demostrado de manera sólida en los modelos preclínicos de asma (Malaviya *et al.*, *Int Immunopharmacol*, **2010**, 10, 829-836; Matsunaga *et al.*, *Biochem y Biophys Res Commun*, **2011**, 404, 261-267; Kudlacz *et al.*, *Eur J Pharmacol*, **2008**, 582, 154-161.) En consecuencia, los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos respiratorios inflamatorios tal como el asma. La inflamación y fibrosis del pulmón son característicos de otras enfermedades respiratorias además del asma tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística (CF), la neumonitis, las enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática),

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

la lesión pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la bronquitis, el enfisema y la bronquiolitis obliterante. Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, por lo tanto, pueden ser 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 agudo, la bronquitis, el enfisema, la bronquiolitis obliterante, la bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa (también denominado COS), la disfunción primaria del injerto (PGD), la neumonía organizativa (OP), el rechazo agudo (AR), la bronquiolitis linfocítica (LB), la disfunción pulmonar crónica del aloinjerto (CLAD), el CLAD restrictivo (rCLAD o RAS), la disfunción del injerto neutrofílica y la sarcoidosis.

En un aspecto, por lo tanto, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad respiratoria en un mamífero (p. ej., un ser humano), el método comprende la administración al mamífero un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de estos o una forma cristalina de estos.

En un aspecto, la enfermedad respiratoria es asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (CF), neumonitis, enfermedades pulmonares intersticiales (incluida la fibrosis pulmonar idiopática), lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria agudo, bronquitis, enfisema, bronquiolitis obliterante, bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa (también denominado COS), disfunción primaria del injerto (PGD), neumonía organizativa (OP), el rechazo agudo (AR), bronquiolitis linfocítica (LB), disfunción pulmonar crónica del aloinjerto (CLAD), CLAD restrictivo (rCLAD o RAS), disfunción del injerto neutrofílica, rinitis alérgica o sarcoidosis. En otro aspecto, la enfermedad respiratoria es el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En un aspecto adicional, la enfermedad respiratoria es una infección pulmonar, una infección helmíntica, hipertensión arterial pulmonar, sarcoidosis, linfangioleiomiomatosis, bronquiectasias o una enfermedad pulmonar infiltrativa.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

En otro aspecto adicional, la enfermedad respiratoria es neumonitis inducida por el medicamento, neumonitis inducida por hongos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, granulomatosis eosinofílica con poliangitis, neumonía eosinofílica idiopática aguda, neumonía eosinofílica idiopática crónica, síndrome hipereosinofílico, síndrome de Löffler, bronquiolitis obliterante con neumonía organizativa o neumonitis inducida por el inhibidor de puntos de control inmunitario.

La divulgación da a conocer además un método para tratar una enfermedad respiratoria, el método comprende la administración a el mamífero una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos útiles para las enfermedades respiratorias.

Enfermedades oculares

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, o una forma cristalina 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, oclusión de la vena retiniana (OVR) y queratoconjuntivitis atópica.

En particular, uveítis (Horai y Caspi, *J Interferon Cytokine Res*, **2011**, 31, 733-744), retinopatía diabética (Abcouwer, *J Clin Cell Immunol*, **2013**, Suppl 1, 1-12), edema macular diabético (Sohn *et al.*, *American Journal of Ophthalmology*, **2011**, 152, 686-694), enfermedad del ojo seco (Stevenson *et al.*, *Arch Ophthalmol*, **2012**, 130, 90-100), oclusión de la vena retiniana (Shchuko *et al.*,

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Indian Journal of Ophthalmology, **2015**, 63(12), 905-911) y degeneración macular relacionada con la edad (Knickelbein *et al.*, *Int Ophthalmol Clin*, **2015**, 55(3), 63-78) se caracterizan por la elevación de determinados citocinas proinflamatorias que señalizan a través de la vía de la 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 una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, y un portador farmacéutico en el 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, oclusión de la vena retiniana o queratoconjuntivitis atópica. En un aspecto, el método comprende la administración del compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, mediante inyección intravítrea.

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos útiles para las enfermedades oculares.

Otras enfermedades

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, también pueden ser útiles para tratar otras enfermedades tales como otras enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias o cánceres.

Los compuestos de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, o una forma cristalina de estos, pueden ser útiles para tratar una o más de estas enfermedades: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, rechazo de trasplante, xeroftalmia, artritis psoriásica, diabetes, insulino dependiente, enfermedad de la motoneurona, síndrome mielodisplásico,

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

dolor, sarcopenia, caquexia, choque séptico, lupus sistémico eritematoso, 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 Hodgkin, cáncer pulmonar de células no pequeñas, 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.

Los compuestos de la divulgación han demostrado ser inhibidores potentes de la enzima de la JAK3 y ser selectivos para la JAK3 por encima de JAK1, JAK2 y TYK2 en los ensayos de unión de enzimas y que tienen una actividad funcional potente para la JAK3 en un ensayo celular como se describe en los siguientes ejemplos.

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
Calcd	=	calculado
Boc	=	terc-butiloxycarbonilo
d	=	días
DIPEA	=	<i>N,N</i> -diisopropiletiloamina
DMF	=	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	=	sulfóxido de dimetilo
EtOAc	=	acetato de etilo
EtOH	=	alcohol etílico
h	=	horas

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

HATU=	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilo-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio hexafluorofosfato
IPA =	alcohol isopropílico
MeOH=	metanol
min =	minutos
RT o rt =	temperatura ambiente
SiG =	gel de sílice
TEA =	triethylamina
THF =	tetrahidrofurano
THP =	tetrahidropirano
TFA =	ácido trifluoroacético

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 -RMN. Para el análisis de RMN, se disolvieron las muestras en solvente deuterado (tal como CD_3OD , CDCl_3 , o d_6 -DMSO), y se adquirió un espectro de ^1H -RMN 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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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

A menos que se indique lo contrario, se usaron las siguientes condiciones para las purificaciones de la HPLC preparativa.

Columna: C18, 5 μ m 21,2 $\times$ 150 mm o C18, 5 μ m 21 $\times$ 250 mm 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 disuelven en agua/ácido acético 1:1 a aproximadamente 50 mg/mL. Se llevó a cabo una operación de prueba de calamina analítica de 4 minutos usando una columna de 2,1 mm $\times$ 50 mm C18 seguida de una operación de calamina 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 de calamina 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.

Condiciones de la HPLC analítica

Método A

Columna: LUNA C18 (2); 150 $\times$ 4,60 mm; 3 μ m

Temperatura de la columna: 37 °C

Caudal: 1,0 mL/min

Volumen de inyección: 5 μ L

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

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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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

Longitud de onda para la detección: 250 nm

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

Método B

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

Temperatura de la columna: 37 °C

Caudal: 1,0 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

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

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

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

Longitud de onda para la detección: 254 nm

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

Se obtuvieron los patrones de la difracción de radiografías en polvo con un difractor de radiografías Bruker D8-Advance usando una radiación de Cu-K α ($\lambda = 1,54051 \text{ \AA}$) con un voltaje de salida de 45 kV y una corriente de 40 mA. El instrumento se operó en una geometría de Bragg-Brentano con rodillos de incidencia, divergencia y dispersión configurados para maximizar la intensidad en la muestra. Para la medición, se sometió a presión una pequeña cantidad de polvo (5 mg a 25 mg) en un soporte de muestras para formar una superficie lisa y se sometió a la exposición de radiografías. Se escanearon las muestras en un modo de 2θ - 2θ de 2° a 35° en 2θ con un tamaño del paso de 0,02° y una velocidad de escaneo de 0,30°segundos por paso. El software de medición Bruker DiffracSuite controló la adquisición de datos y el software Jade la analizó (versión 7.5.1). Se calibró el instrumento con un corindón estándar, en un ángulo dos-theta $\pm 0,02^\circ$.

Se realizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un módulo de instrumentos TA modelo Q-100 con un controlador del análisis térmico. Se recopilaron los datos y se analizaron con el software de análisis técnico con los

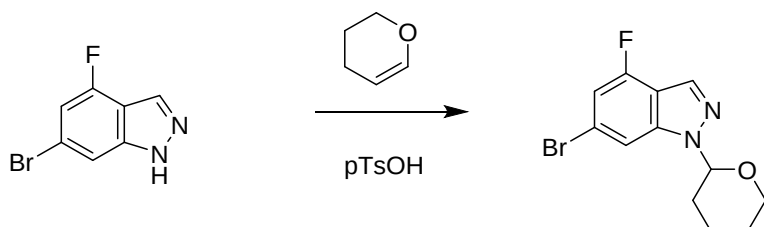
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

instrumentos TA. Se ponderó de forma exacta una muestra de cada forma cristalina en una bandeja de aluminio cubierta. Después de un período de equilibrio isotérmico de 5 minutos a 5 °C, se calentó la muestra usando una rampa de calentamiento lineal de 10 °C/min de 0 °C a 300 °C.

Se realizaron las mediciones del análisis gravimétrico térmico (TGA) con un módulo de instrumentos TA modelo Q-50 equipado con una capacidad de alta resolución. Se recopilaron los datos usando un controlador de análisis térmico con los instrumentos TA y se analizaron usando un software de análisis universal con los instrumentos TA. Se colocó una muestra ponderada en una bandeja de platino y se escaneó con una tasa de calentamiento de 10 °C desde la temperatura ambiente hasta 300 °C a 350 °C. Las cámaras de horno y equilibrio se purgaron con flujo de nitrógeno durante el uso.

Se realizaron mediciones de adsorción de humedad dinámica (DMS) con un microbalance atmosférico de VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se usó una muestra ponderada y la humedad estaba en un valor lo más bajo posible (cercana al 0% de HR) al comienzo del análisis. El análisis de DMS consistió en una etapa de secado inicial (0% de HR) durante 120 minutos, seguido de dos ciclos de adsorción y desorción con una tasa de escaneo del 5% de HR/paso por encima del rango de humedad del 5% de HR a 90% de HR. Se realizó la ejecución del DMS de manera isotérmica a 25 °C.

Preparación 1: 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol

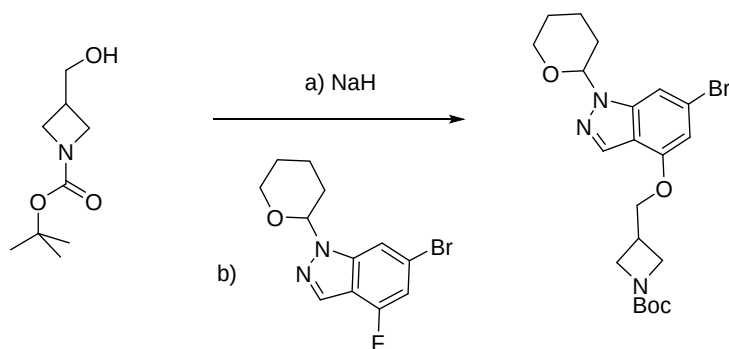


Una mezcla de 6-bromo-4-fluoro-1h-indazol (5 g, 23,25 mmol), 3,4-dihidro-2H-pirano (6,38 mL, 69,8 mmol) y ácido monohidrato de p-toluenosulfónico (0,442 g, 2,325 mmol) en DCM (76 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la reacción y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash en columna usando un gradiente de 0% a

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

60% EtOAc/Hexanos para obtener el producto deseado (6,08 g, rendimiento del 87%).

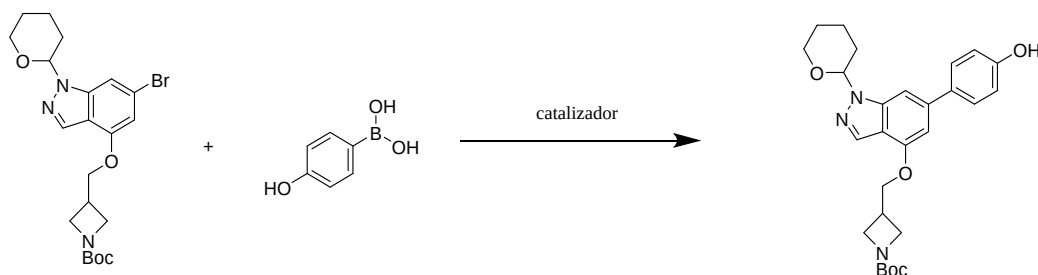
Preparación 2: terc-butilo 3-(((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato



Se agregó lentamente hidruro de sodio (1,003 g, 41,8 mmol) a la solución de agitación de 1-Boc-azetidina-3-il-metanol (6,89 g, 36,8 mmol) en DMF (60 mL) en una atmósfera de N₂ a 0 °C y se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente. La mezcla de reacción espumosa se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de que se enfriara nuevamente 0 °C. Se insertó por cánula lentamente una solución de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (5,00 g, 16,71 mmol) en DMF (20 mL) en la mezcla de reacción, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se desactivó la reacción con una adición lenta de H₂O (150 mL) y EtOAc (100 mL) y se permitió que se agitara durante 5 minutos. Se agregó agua adicional (100 mL) y se extrajo la mezcla bifásica con EtOAc (3 × 100 mL). Las fracciones orgánicas combinadas luego se lavaron con 1:1 H₂O:salmuera (3 × 100 mL) y se secaron con Na₂SO₄. Se purificó el aceite ligeramente rosa transparente resultante mediante cromatografía flash en columna usando un gradiente de 0% a 100% EtOAc/hexanos para obtener el producto deseado como un aceite viscoso, incoloro y transparente (7,34 g, 15,74 mmol, rendimiento del 94%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₈BrN₃O₄ 466,13 hallado 466,1.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 3: terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

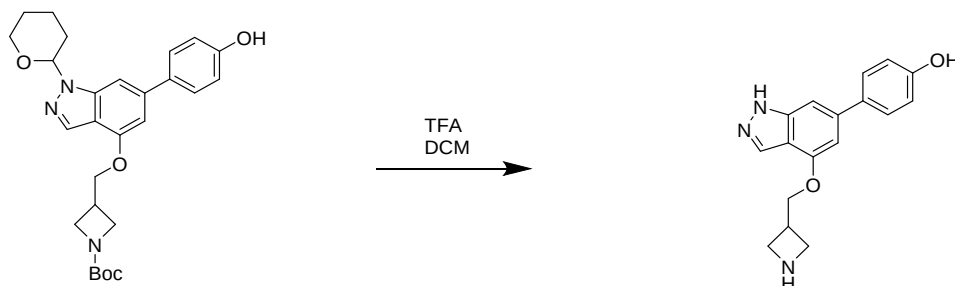


Se agregó el aducto dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano adduct (1,93 g, 2,36 mmol) a una solución de ácido 4-hidroxibencenoborónico (3,26 g, 23,61 mmol), terc-butilo 3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (7,34 g, 15,74 mmol), y fosfato de potasio (10,02 g, 47,2 mmol) en 1,4-dioxano (63,0 mL) y agua (15,74 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con N₂ durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (20 mL) y se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3 × 20 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna usando el 50% de acetato de etilo en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

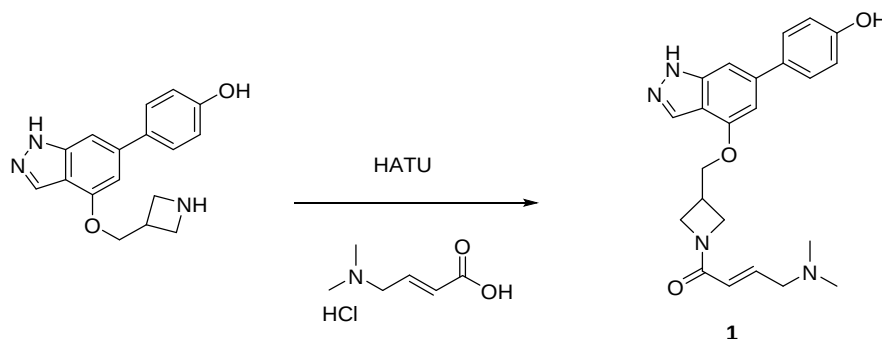
indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (7,55 g, 15,74 mmol, rendimiento del 100%). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{27}H_{33}N_3O_5$ 480,24 hallado 480,1.

Preparación 4: 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol



TFA (10,90 mL) se agregó lentamente a una solución de terc-butil 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (7,84 g, 16,35 mmol) en diclorometano (21,80 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La reacción se concentró *in vacuo* para obtener 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol como una sal TFA (6,69 g, 16,35 mmol, rendimiento del 100%). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{17}H_{17}N_3O_2$ 296,13 hallado 296,1.

Ejemplo 1A: (E)-4-(dimetiloamino)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-one

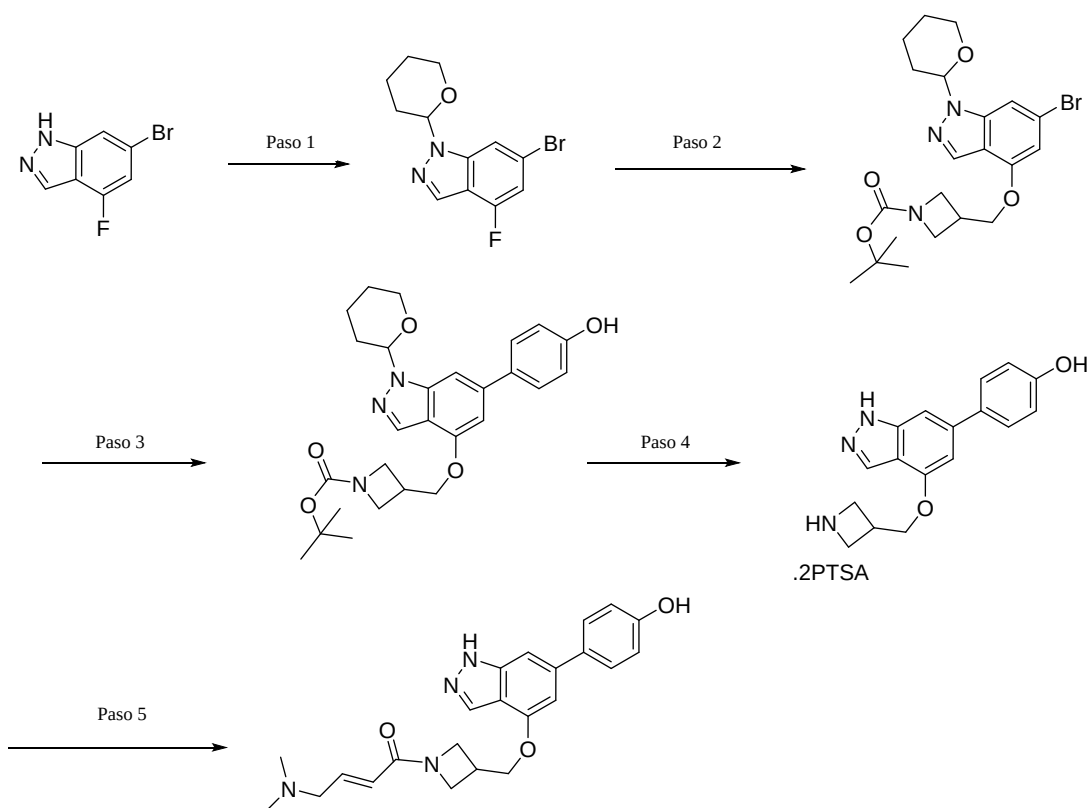


Se agregó HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilouronio hexafluorofosfato, 817 mg, 2,150 mmol) a una solución de clorhidrato ácido (E)-4-(dimetiloamino)but-2-enoico (405 mg, 2,44 mmol) en DMF (2,00 mL) y la

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregó la sal TFA 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol (800 mg, 1,954 mmol), seguido de DIPEA (1,707 mL, 9,77 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró *in vacuo* para obtener un líquido amarillo. El líquido crudo se purificó mediante la cromatografía en columna de la escala preparatoria C18 usando un gradiente del 20% al 80% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de ácido trifluoroacético para obtener (E)-4-(dimetiloamino)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-one como una sal TFA (235,0 mg, 0,578 mmol, rendimiento del 29,6%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₆N₄O₃ 407,20 hallado 407,2. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,07 (s, 1H), 10,33 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,55 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,21 (s, 1H), 6,86 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,79 (s, 1H), 6,66 – 6,58 (m, 1H), 6,45 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 4,45 – 4,36 (m, 2H), 4,17 – 4,07 (m, 2H), 3,91-3,83 (m, 3H), 3,22-3,10 (m, 2H), 2,75 (s, 6H).

Ejemplo 1B: Forma 4 de cristalina (E)-4-(dimetiloamino)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-one



P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Paso 1

A una suspensión de 6-bromo-4-fluoro-1H-indazol (20,0 g, 93 mmol) en 200 mL de DCM, se agregó ácido monohidrato p-toluenosulfónico (1,769 g, 9,30 mmol). La mezcla de reacción siguió siendo una suspensión. Luego se agregó 3,4-dihidro-2H-pirano (16,97 mL, 186 mmol). Se observó una completa disolución de los sólidos después de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche para formar una solución oscura. Se agregaron 200 mL de bicarbonato acuoso, se separaron las fases y se lavó la capa orgánica con 200 mL de salmuera y se secó con sulfato de sodio. Se filtró la solución a través de un tapón de sílice para eliminar el color oscuro y se lavó el sílice con 300 mL de DCM. Se evaporó el solvente para obtener 25 g de producto como un sólido blancuzco.

Paso 2A

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se agregó terc-butil 3-(hidroximetilo)azetidina-1-carboxilato (22,53 g, 120 mmol) y 100 mL de dimetiloacetamida (DMAc). Se purgó el matraz con nitrógeno. Se agregó carbonato de Cesio (39,2 g, 120 mmol). Se agregó 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (24 g, 80 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 2 días. Se agregó un adicional de 0,5eq de terc-butil 3-(hidroximetilo)azetidina-1-carboxilato y carbonato de Cesio y la reacción se calentó a 70 °C durante la noche para proporcionar una conversión completa. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y luego se vertió lentamente en agua fría helada agitada (700 mL). El lodo resultante se agitó durante 20 minutos y luego se filtró y se secó para obtener 32 g de producto. Se cristalizó el producto a partir de metanol-agua al agregar agua lentamente como antisolvente hasta la turbidez. Se desarrolló un lodo blanco con el tiempo. Se filtró y se secó el sólido para obtener 28 g de material de más del 98% puro.

Paso 2B

Opcionalmente, se agregó t-butoxido de potasio una solución de terc-butil 3-(hidroximetilo)azetidina-1-carboxilato en DMAc a 0 °C. Después de

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

60 minutos, se agregó 6-Bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol a 0 °C y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, con lo que se logró una conversión completa limpia en menos de 6 horas.

Paso 3

En un frasco Schlenk de 250 mL se agregó terc-butil 3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (10,0 g, 21,44 mmol) y 80 mL de dioxano. Se agregó ácido (4-hidroxifenil)borónico (4,44 g, 32,2 mmol). Se agregó anhídrido tribásico de fosfato de potasio (13,65 g, 64,3 mmol) con 20 mL de agua y la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno. Se agregó el aducto $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,876 g, 1,072 mmol) y se rellenó el matraz con un condensador con nitrógeno tres veces. Se calentó la mezcla de reacción a 110 °C durante 2 h y 30 minutos para mostrar una conversión completa mediante HPLC. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y luego se eliminó la mayoría del dioxano. Se agregaron 150 mL de cloruro de amonio saturado seguido de 150 mL de acetato de etilo. Se ajustó el pH a neutro con 1M ac HCl. Se separaron las fases y se secó la capa orgánica con sulfato de sodio seguido de eliminación del solvente. Se disolvió el producto sin procesar en 150 mL de DCM y se cargaron en la columna 300 g SiG, se eluyó con 20%-50% de acetato de etilo en hexanos. Se combinaron las fracciones puras y se evaporó el solvente. Se agregaron 100 mL de MeTHF, seguido de una adición de semillas cristalinas. Se desarrolló un lodo a lo largo del tiempo. Se agregaron 100 mL de DIPE y se agitó el lodo durante la noche. El filtrado y el secado rindieron 7,9 g de material puro (>99%).

Paso 4

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se agregó terc-butil 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (85 g, 177 mmol) en 400 mL de metanol. Se agregó ácido monohidrato p-toluenosulfónico (101 g, 532 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente para obtener aproximadamente 90% de conversión después de 2 días. Se agitó la mezcla de reacción durante otras 24 horas a temperatura ambiente para obtener aproximadamente 96% de

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

conversión. Se agregó 400 mL de diisopropil éter y el lodo resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y formó una sal cristalina durante la noche. El filtrado y el secado con nitrógeno tuvieron un rendimiento de 100 g de >99% de puro material como una sal PTSA bis.

Paso 5

En un matraz con parte inferior redonda de 100 mL se agregó ácido (E)-4-(dimetiloamino)but-2-enoico, HCl (1,899 g, 11,46 mmol) y 20 mL de DMF. Se agregó HCTU o-(1h-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilouronio hexafluorofosfato (4,91 g, 11,46 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. En un matraz separado se agregó 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol, 2TFA (5,0 g, 9,55 mmol) y 20 mL de DMF. La solución resultante se enfrió a 0 °C, luego se agregó lentamente DIPEA (5 mL, 38,2 mmol, 3 eq). Se agregó la solución anterior (más de 5 minutos) a la mezcla de reacción del ácido y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregó un equivalente adicional de DIPEA gota a gota. Se observó la conversión completa mediante la HPLC después de 20 minutos a temperatura ambiente. Se virtió la mezcla de reacción en 200 mL de agua agitada. Se precipitaron los sólidos adhesivos en un pH de aproximadamente 7. Se ajustó cuidadosamente el pH a aproximadamente 8 con amoníaco acuoso. Se extrajo la solución tres veces con 100 mL de MeTHF. Se secaron las capas orgánicas con sulfato de sodio y luego se eliminó el solvente. Se disolvió el producto base libre crudo en 25 mL de 10% metanol en DCM, cargado en una columna de gel de sílice de 125 g y se eluyó con 10% de metanol isocrático en DCM que contenía un 0,5% de amoníaco acuoso. Se combinaron las fracciones puras y se evaporó el solvente. La recristalización a partir de acetona rindió un >98% de material puro (rendimiento del 50%).

Se suspendieron 25 mg del compuesto 1 en 1 mL de agua. Se agitó la suspensión resultante durante 2 días a 50 °C, se filtró, se lavó con 2 mL de agua y se secó en condiciones de ambiente durante un par de horas para obtener la Forma 4.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Opcionalmente, el compuesto 1 se disolvió en etanol y agua o metanol y agua mediante la disolución completa en 10 volúmenes de alcohol seguida de una adición lenta de aproximadamente 8 a 10 volúmenes de agua hasta el punto de enturbiamiento. Se agregaron las moléculas iniciales de la Forma 4 y se desarrolló lentamente un lodo resultante con el paso del tiempo. Luego, se agregó lentamente más agua (aproximadamente 10 volúmenes) y el sólido se filtró y se secó para obtener la Forma 4.

Ejemplo 1C: Forma 3 de cristalina (E)-4-(dimetiloamino)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-one

La Forma 3 es una forma cristalina de anhidro libre del compuesto 1.

Se suspendieron 150 mg del compuesto 1 en 2 mL de una mezcla de acetonitrilo e isopropanol 1:1. Se agitó la suspensión resultante durante 1 día a 50 °C, se filtró, se lavó con 2 mL de una mezcla de acetonitrilo e isopropanol 1:1 y se secó en condiciones ambiente durante un par de horas para obtener la Forma 3, que se determinó que es una base cristalina de anhidro libre.

Opcionalmente, 200 mg del compuesto 1 como una base libre amorfa se disolvieron en 2 mL de IPA a temperatura ambiente. Se agregó una cantidad igual de acetonitrilo. Se agregó más compuesto (0,5 g en total) hasta que se formó la solución saturada. Se agregaron las moléculas iniciales y se agitó la mezcla durante la noche. Se desarrolló un lodo blanco con el tiempo. El filtrado y el secado rindieron 400 mg del producto como la Forma 3, que se determinó que es una base anhidro libre.

Ejemplo 1D: Caracterización de la Forma 3

Se analizaron las muestras de la Forma 3 mediante difracción de radiografías en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA) y adsorción de humedad dinámico (DMS).

Difracción de radiografías en polvo

El patrón de difracción de radiografías en polvo de la Forma 3 se muestra en la Figura 9.

Las posiciones del pico dos-theta de PXRD y el espaciado d se muestran a continuación.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

2-Theta	d(Å)	Área	A%
4,82	18,32	16.367	2,7
9,67	9,14	610.151	100,0
11,61	7,61	140.214	23,0
11,92	7,42	49.009	8,0
12,98	6,81	21.804	3,6
13,23	6,69	21.840	3,6
15,69	5,64	88.944	14,6
16,19	5,47	89.861	14,7
16,45	5,38	74.091	12,1
16,67	5,31	57.780	9,5
17,61	5,03	158.810	26,0
18,88	4,70	261.799	42,9
19,39	4,57	26.844	4,4
19,96	4,45	164.339	26,9
20,14	4,40	125.226	20,5
22,14	4,01	52.100	8,5
23,33	3,81	74.095	12,1
23,84	3,73	166.452	27,3
24,06	3,70	200.590	32,9
24,29	3,66	79.151	13,0
25,31	3,52	119.197	19,5
25,63	3,47	88.838	14,6
27,06	3,29	62.513	10,2
27,31	3,26	47.507	7,8
30,10	2,97	18.475	3,0
30,53	2,93	16.406	2,7

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Análisis térmico

Un termograma de DSC representativo de la forma libre cristalina Forma 3 de la invención se muestra en la Figura 10. El trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe un pico en el flujo térmico endotérmico, identificado como una transición de fusión, con un inicio a aproximadamente 197,7 °C y un pico a aproximadamente 201,3 °C. Después de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a aproximadamente 201,3 °C.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico a una temperatura entre aproximadamente 197,7 °C y aproximadamente 204 °C.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 3 de la invención se muestra en la Figura 11. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Figura 11 no muestra una pérdida significativa de peso a temperaturas por debajo del inicio de la descomposición a aproximadamente 195 °C.

Evaluación de sorción de humedad dinámica

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 3 de la invención se muestra en la Figura 12.

La Forma 3 demostró aproximadamente un 0,33% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 3 se considera no higroscópica.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ejemplo 1E: Caracterización de la Forma 4

Se analizaron las muestras de la Forma 4 mediante difracción de radiografías en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA) y sorción de humedad dinámica (DMS).

Difracción de radiografías en polvo

El patrón de difracción de radiografías en polvo de la Forma 4 se muestra en la Figura 13.

Las posiciones del pico dos-theta de PXRD y el espaciado d se muestran a continuación.

2-Theta	$d(\text{\AA})$	Área	A%
6,26	14,10	161.835	73,90
11,86	7,46	51.703	23,60
12,51	7,07	82.712	37,80
13,16	6,72	72.445	33,10
14,98	5,91	53.903	24,60
16,55	5,35	218.849	100,00
16,94	5,23	133.498	61,00
17,61	5,03	28.496	13,00
18,33	4,84	170.874	78,10
18,78	4,72	35.644	16,30
19,39	4,57	92.940	42,50
19,57	4,53	86.983	39,70
19,84	4,47	19.121	8,70
21,45	4,14	22.435	10,30
21,82	4,07	22.934	10,50
22,57	3,94	62.931	28,80
23,61	3,76	162.063	74,10
24,24	3,67	135.952	62,10

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

24,67	3,61	38.471	17,60
25,10	3,54	55.236	25,20
25,39	3,51	32.363	14,80
27,19	3,28	27.010	12,30
27,39	3,25	32.148	14,70
28,55	3,12	24.879	11,40
31,51	2,84	18.975	8,70

Análisis térmico

Un termograma de DSC representativo de la forma libre cristalina Forma 4 se muestra en la Figura 14. El trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado con una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe una desolvatación endotérmica con un inicio a aproximadamente 60,9 °C y un pico a aproximadamente 103,6 °C y una fusión endotérmica caracterizada por un inicio a aproximadamente 167,3 °C. El compuesto se descompone en la fusión. La fusión endotérmica y la descomposición exotérmica se superponen.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 4 se muestra en la Figura 15. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Figura 15 muestra una pérdida de peso de aproximadamente 3,54% a 100 °C. El compuesto se desolvata en la temperatura inicial de aproximadamente 50 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 165 °C.

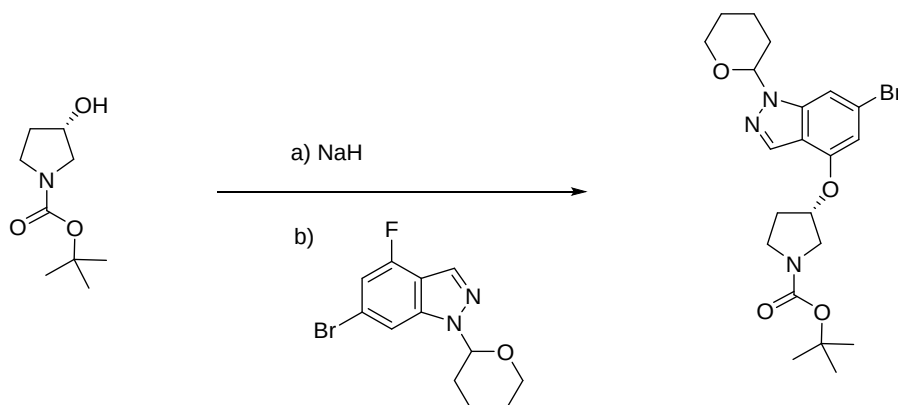
Evaluación de sorción de humedad dinámica

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 4 se muestra en la Figura 16.

La Forma 4 demostró aproximadamente un 5,01% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 4 se considera moderadamente higroscópica.

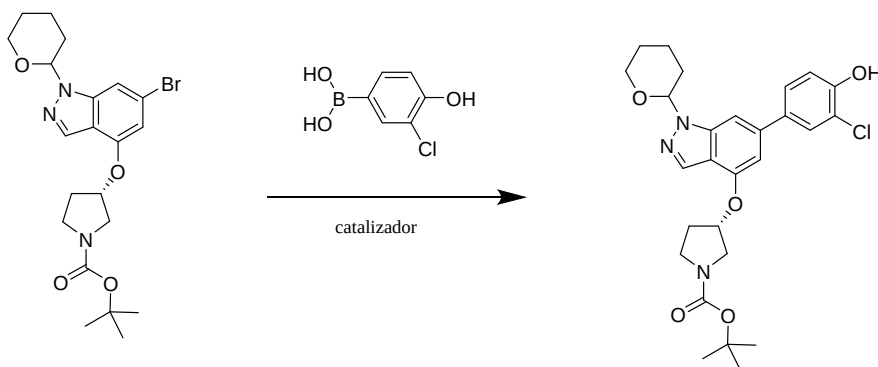
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 5: terc-butil (3S)-3-((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato



Se agregó hidruro de sodio (0,201 g, 8,36 mmol) una solución de (S)-N-boc-3-piridinol (1,25 g, 6,69 mmol) en DMF (12 mL) en una atmósfera de N₂ a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (1,0 g, 3,34 mmol) se agregó y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (1 mL) y la reacción se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna usando el 40% de acetato de etilo en hexanos para obtener terc-butil (3S)-3-((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato (1,40 g, 3,00 mmol, rendimiento del 90%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₈BrN₃O₄ 466,13 hallado 466,1.

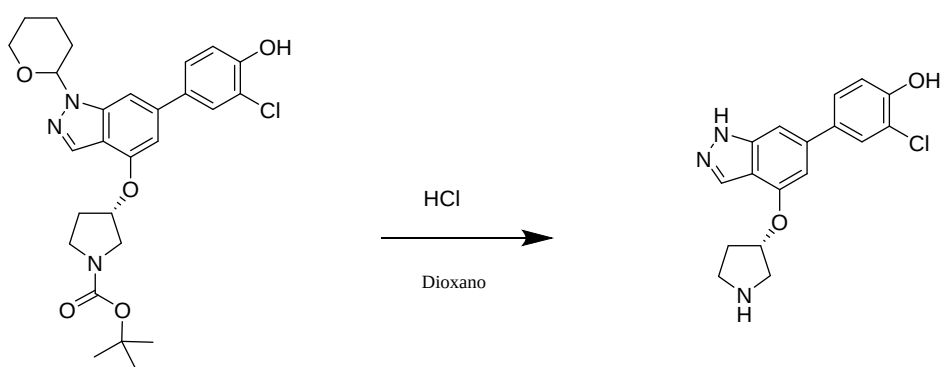
Preparación 6: terc-butil (3S)-3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato



P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Se agregó acetato de paladio (0,135 g, 0,600 mmol) a una solución de ácido 3-cloro-4-hidroxifenilborónico (0,776 g, 4,50 mmol), terc-butil (3S)-3-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato (1,40 g, 3,00 mmol), 1,1'-bis(di-t-butilfosfino)ferroceno (0,285 g, 0,600 mmol) y fosfato de potasio (1,912 g, 9,01 mmol) en 1,4-dioxano (12 mL) y agua (3,00 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (20 mL) y se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3 × 20 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante la cromatografía flash en columna usando 50% de acetato de etilo en hexanos para obtener terc-butil (3S)-3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato (1,35 g, 2,63 mmol, rendimiento del 87%) como un líquido claro amarillo. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₃₂ClN₃O₅ 514,20 hallado 514,2.

Preparación 7: (S)-2-cloro-4-(4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol

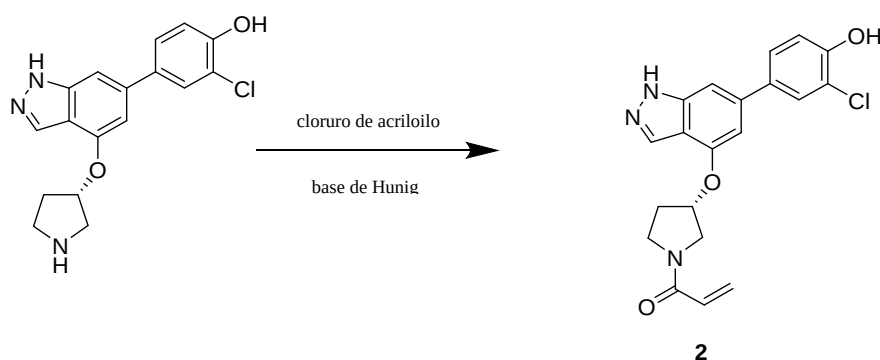


Se agregó 4,0N HCl en dioxano (13,13 mL, 52,5 mmol) a una solución de terc-butil (3S)-3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato (1,35 g, 2,63 mmol) en dioxano (6 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo* para obtener (S)-2-cloro-4-(4-(pirrolidina-3-iloxi)-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

1H-indazol-6-il)fenol como una sal HCl (0,962 g, 2,63 mmol, rendimiento del 100%). (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para $C_{17}H_{16}ClN_3O_2$ 330,09 hallado 330,2.

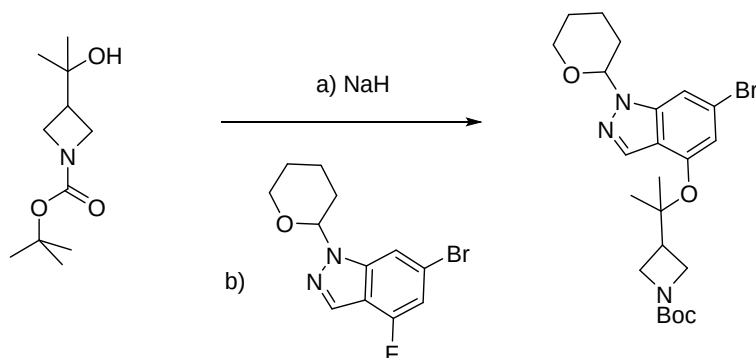
Ejemplo 2: (S)-1-(3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



N,N-Diisopropiletiloamina (4,59 mL, 26,3 mmol) se agregó a una solución de sal de HCl (S)-2-cloro-4-(4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol (0,962 g, 2,63 mmol) en DMF (13,0 mL) a 0 °C, seguido de cloruro de acrilóil (0,277 mL, 3,41 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos luego se concentró a un volumen de aproximadamente 2 mL. El líquido crudo se purificó mediante la cromatografía en columna de la escala preparatoria C18 usando un gradiente del 20% al 80% de acetonitrilo en agua con un 0,05% de ácido trifluoroacético para obtener (S)-1-(3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como una sal TFA (344 mg, 0,691 mmol, rendimiento del 26,3%). (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para $C_{20}H_{18}ClN_3O_3$ 384,10 hallado 384,1. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,03 (s, 1H), 10,33 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,74-7,67 (m, 1H), 7,57-7,49 (m, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,07 (d, J = 0,5 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,69 – 6,56 (m, 1H), 6,18-6,11 (m, 1H), 5,71-5,62 (m, 1H), 4,01-3,60 (m, 5H), 2,35-2,14 (m, 2H).

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 8: terc-butil 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato

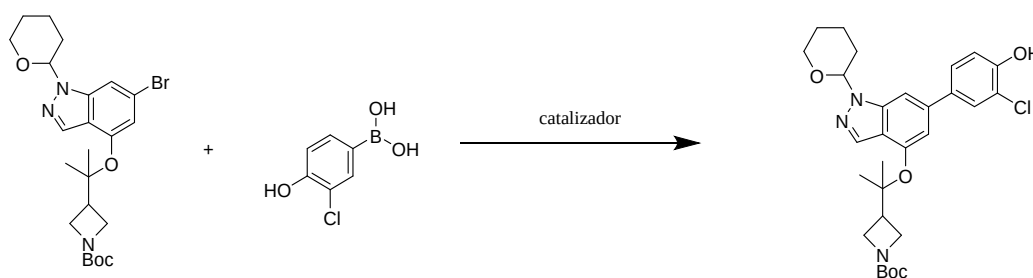


A un vial de centelleo seco purgado con N₂, *tert*-butil 3-(2-hidroxipropan-2-il)azetidina-1-carboxilato (374 mg, 1,74 mmol) se agregó, disuelto en 2,4 mL DMF y la solución se enfrió a 0 °C. Se agregó lentamente el 60% de hidruro de sodio por peso en aceite mineral (134 mg, 3,34 mmol) a la solución de agitación y se permitió que la reacción se calentara a temperatura ambiente después de la adición. La reacción espumosa se agitó durante 30 minutos antes de que se enfriara nuevamente a 0 °C. Una solución de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (400 mg, 1,34 mmol) en 1 mL DMF se agregó lentamente en el vial de centelleo que contiene la solución de organosodio. Después de la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, luego de lo cual LCMS indicó la conversión completa del material de partida al producto deseado. Se desactivó la reacción con una adición lenta de 1 mL H₂O y 1 mL EtOAc, que se permitió que se agitara durante 5 minutos. La solución bifásica luego se transfirió a un embudo separador y se agregaron 5 mL adicionales de H₂O. Se extrajo la mezcla con 10 mL de EtOAc 3 veces y se descartó la capa acuosa. Luego, las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con 3 × 10 mL de H₂O:salmuera 1:1 para eliminar el DMF residual. Luego, la solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un aceite ligeramente amarillo. El aceite luego se purificó mediante la cromatografía flash en columna usando un gradiente de 0% a 40%

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

EtOAc:hexanos. Se aisló el producto puro como un aceite transparente, incoloro y fiscos (288 mg, rendimiento del 44%).

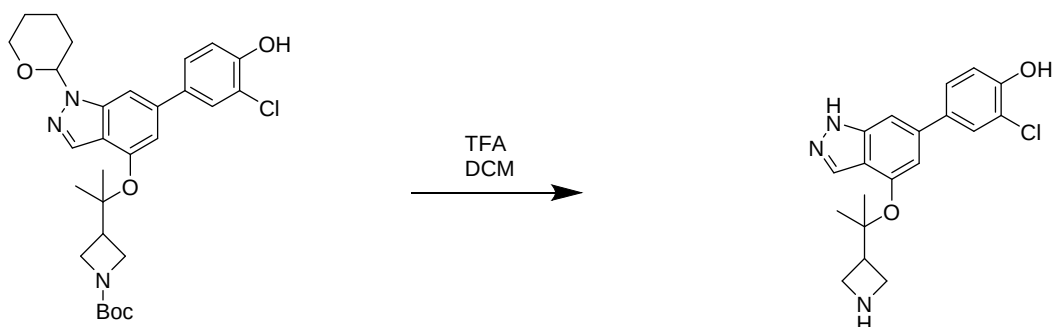
Preparación 9: terc-butil 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato



Se agregó una mezcla 1:1 de acetato de paladio (26,2 mg, 0,116 mmol) y 1,1'-Bis(di-t-butilfosfino)ferroceno (55,3 mg, 0,116 mmol) una solución de ácido 3-cloro-4-hidroxibencenoborónico (151 mg, 0,874 mmol), terc-butil 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (288 mg, 0,582 mmol), y fosfato de potasio (371 mg, 1,747 mmol) en 1,4-dioxano (2,0 mL) y agua (0,50 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 × 5 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna usando 40% de acetato de etilo en hexanos para obtener terc-butil 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (230 mg, 0,424 mmol, rendimiento del 73%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₆N₃O₅ 542,24 hallado 542,3.

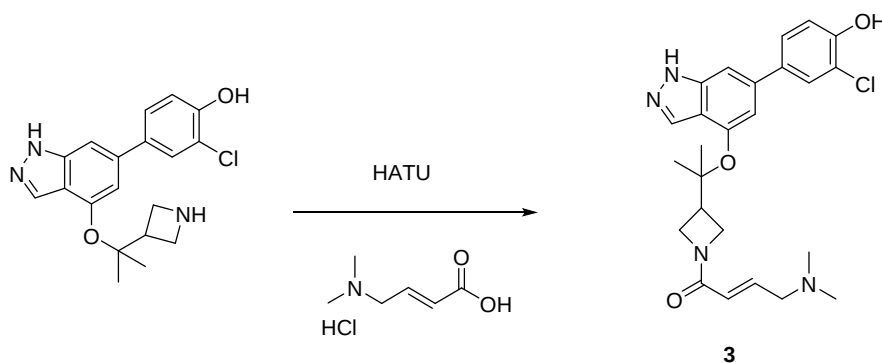
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 10: 4-(4-((2-azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-clorofenol



Se disolvió terc-butil 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (230 mg, 0,424 mmol) en diclorometano (1 mL) y se agregó lentamente TFA (1 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, luego de lo cual, la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La reacción se concentró a la reducción para proporcionar 4-(4-((2-azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-clorofenol como una sal TFA (rendimiento del 100%). (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para $C_{19}H_{20}N_3O_2$ 358,13 hallado 358,1.

Ejemplo 3A: (E)-1-(3-(2-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)-4-(dimetiloamino)but-2-en-1-ona



Se agregó HATU (2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilouronio hexafluorofosfato, 100 mg, 0,263 mmol) a una solución de clorhidrato ácido (E)-4-(dimetiloamino)but-2-enoico (34 mg, 0,263 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se agregó sal TFA 4-(4-((2-azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-clorofenol (118 mg, 0,251 mmol), seguido de DIPEA (0,438 mL, 2,507 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante la SFC (cromatografía de fluidos supercríticos) de escala preparatoria usando metanol con dióxido de carbono líquido para obtener (E)-1-(3-(2-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)-4-(dimetiloamino)but-2-en-1-ona (41,3 mg, 0,084 mmol, rendimiento del 33%). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{25}H_{29}ClN_4O_3$ 469,20 hallado 469,2. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13,07 (s, 1H), 10,33 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,62 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,47 (dd, $J = 8,5, 2,3$ Hz, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,04 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 1,1$ Hz, 1H), 6,63 – 6,53 (m, 1H), 6,39 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H), 4,37 – 4,23 (m, 2H), 4,11 – 3,91 (m, 2H), 3,69 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,02 – 2,90 (m, 1H), 2,62 (s, 9H), 1,32 (s, 9H).

Ejemplo 3B: Forma 1 cristalina (E)-1-(3-(2-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)-4-(dimetiloamino)but-2-en-1-ona

La Forma 1 es una forma cristalina de anhidro libre del compuesto 3.

Se disolvieron 80 mg del compuesto 3 como una base amorfa libre en 0,5 mL de etanol. La mezcla resultante se agitó durante un día a temperatura ambiente y dio como resultado un precipitado. Se aisló el sólido mediante el filtrado, se lavó con 1 mL de etanol y se secó en condiciones ambiente durante un par de horas para obtener la Forma 1.

Opcionalmente, en un matraz de fondo redondo de 50 mL, se agregó el compuesto 3 que se purificó mediante SiG (1,3 g, 2,77 mmol). Se agregaron 10 mL de acetona y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Se agregaron las moléculas iniciales de la base cristalina libre de la Forma 1. Se desarrolló un lodo blanco espeso con el tiempo. El filtrado y el secado dieron como resultado 1 g de base cristalina libre de la Forma 1 con una pureza del >98%.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ejemplo 3B: Forma 2 cristalina (E)-1-(3-(2-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)-4-(dimetiloamino)but-2-en-1-ona

La Forma 2 es una forma cristalina de hidrato de base libre del compuesto 3.

Se disolvieron 55 mg de base libre amorfa del compuesto 3 en 0,25 mL de metanol. En esta etapa, se agregó agua como un antisolvente en una proporción de aproximadamente 1:2 metanol:agua. La mezcla resultante se sometió a ultrasonido durante varios minutos a temperatura ambiente y dio como resultado un precipitado. Se agitó la suspensión resultante durante 1 día a temperatura ambiente, se filtró, se lavó con 1 mL de metanol y se secó para obtener la Forma 2.

Opcionalmente, el compuesto 3 se disolvió en etanol y agua o metanol y agua mediante la disolución completa en 10 volúmenes de alcohol seguida de una adición lenta de aproximadamente 8 a 10 volúmenes de agua hasta el punto de enturbiamiento. Se agregaron las moléculas iniciales de la Forma 2 y un lodo resultante se desarrolló lentamente con el paso del tiempo. Luego, se agregó lentamente más agua (aproximadamente 10 volúmenes) y el sólido resultante se filtró y se secó para obtener la Forma 2.

Ejemplo 3C: Caracterización de la Forma 1

Se analizaron las muestras de la Forma 1 mediante difracción de radiografías en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA) y sorción de humedad dinámica (DMS).

Difracción de radiografías en polvo

El patrón de difracción de radiografías en polvo de la Forma 1 se muestra en la Figura 1.

Las posiciones del pico dos-theta de PXRD y el espaciado d se muestran a continuación.

2-Theta	$d(\text{\AA})$	Área	A%
5,65	15,63	343.682	100,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

7,12	12,40	17.888	5,2
10,02	8,82	13.064	3,8
11,16	7,92	60.848	17,7
13,10	6,75	13.327	3,9
14,22	6,22	343.837	100,0
14,82	5,97	158.470	46,1
15,16	5,84	338.146	98,3
16,55	5,35	84.525	24,6
17,06	5,19	188.182	54,7
19,31	4,59	251.362	73,1
20,08	4,42	57.430	16,7
21,08	4,21	29.843	8,7
21,65	4,10	45.528	13,2
22,51	3,95	88.807	25,8
22,98	3,87	75.161	21,9
24,43	3,64	95.427	27,8
25,02	3,56	74.549	21,7
25,72	3,46	24.251	7,1
26,80	3,32	23.046	6,7
27,06	3,29	26.069	7,6
28,31	3,15	10.766	3,1
30,08	2,97	45.168	13,1
30,31	2,95	38.502	11,2
32,08	2,79	22.050	6,4

Análisis térmico

Un termograma de DSC representativo de la forma libre cristalina Forma 1 de la invención se muestra en la Figura 2. El trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe un pico en el flujo térmico endotérmico, identificado como una

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

transición de fusión, con un inicio a aproximadamente 154,9 °C y un pico a aproximadamente 162,9 °C. Después de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a aproximadamente 162,9 °C. La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico con un pico a $162,9 \pm 3$ °C.

La forma cristalina se caracteriza por un trazado de la calorimetría diferencial de barrido registrado a una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto que muestra un máximo en el flujo térmico endotérmico a una temperatura entre aproximadamente 154,9 °C y aproximadamente 171 °C.

Un trazado de TGA representativo de la forma libre cristalina Forma 1 se muestra en la Figura 3. El trazado del análisis gravimétrico térmico (TGA) de la Figura 3 muestra una pequeña pérdida de peso de aproximadamente 0,14% a 100 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 175 °C.

Evaluación de sorción de humedad dinámica

Un trazado de DMS representativo de la forma libre cristalina Forma 1 se muestra en la Figura 4.

La Forma 1 demostró aproximadamente un 1,62% de aumento de peso en el rango de humedad del 5% al 90% de humedad relativa. La Forma 1 se considera ligeramente higroscópica.

Ejemplo 3D: Caracterización de la Forma 2

Se analizaron las muestras de la Forma 2 mediante difracción de radiografías en polvo (PXRD), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis gravimétrico térmico (TGA) y sorción de humedad dinámica (DMS).

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Difracción de radiografías en polvo

El patrón de difracción de radiografías en polvo de la Forma 2 se muestra en la Figura 5.

Las posiciones del pico dos-theta de PXRD y el espaciado d se muestran a continuación.

2-Theta	$d(\text{\AA})$	Área	A%
6,90	12,80	248.788	52,1
9,15	9,66	73.363	15,4
10,00	8,84	92.849	19,4
11,18	7,91	42.354	8,9
12,76	6,93	34.590	7,2
13,33	6,64	33.198	6,9
13,82	6,40	75.603	15,8
14,43	6,13	20.656	4,3
15,51	5,71	93.338	19,5
16,04	5,52	19.890	4,2
17,00	5,21	58.922	12,3
17,90	4,95	339.924	71,1
18,31	4,84	477.815	100,0
20,90	4,25	169.039	35,4
22,06	4,03	68.934	14,4
22,51	3,95	110.745	23,2
25,00	3,56	23.916	5,0
26,92	3,31	52.661	11,0
27,26	3,27	63.506	13,3
27,61	3,23	22.650	4,7
29,37	3,04	15.298	3,2
30,53	2,93	24.930	5,2
30,92	2,89	22.089	4,6

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Análisis térmico

Un termograma de DSC representativo de la forma libre cristalina Forma 2 se muestra en la Figura 6. El trazado de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado con una tasa de calentamiento de 10 °C por minuto exhibe una desolvatación endotérmica con un inicio a aproximadamente 52,7 °C y un pico a aproximadamente 84,4 °C y una fusión endotérmica con un inicio a aproximadamente 160,0 °C y un pico a aproximadamente 167,6 °C. Luego de la fusión, siguió la descomposición inmediata.

La Figura 7 muestra una traza representativa de TGA de la forma libre cristalina de la Forma 2 de la invención. El trazado del análisis termogravimétrico (TGA) de la Figura 7 muestra una pérdida de peso de aproximadamente un 6,73% a 75 °C. El compuesto se desolvata a una temperatura inicial de aproximadamente 25 °C. El compuesto se descompone a una temperatura inicial de aproximadamente 185 °C.

Evaluación de sorción de humedad dinámica

La Figura 8 muestra una traza representativa de DMS de la forma libre cristalina de la Forma 2 de la invención. La Forma 2 se convierte en un hidrato (Forma 2b) a una HR superior al 65%. La deshidratación ocurre a una HR inferior al 15%. La absorción de humedad total a una HR entre el 5% y 90% es del 7,99%.

Ejemplo 3E: Caracterización de la Forma 2b

Las muestras de la Forma 2b se analizaron mediante difracción de rayos X de polvos (PXRD).

Difracción de radiografías en polvo

La Figura 17 muestra el patrón de difracción de rayos X de polvos de la Forma 2b.

Las posiciones del pico dos-theta de PXRD y el espaciado d se muestran a continuación.

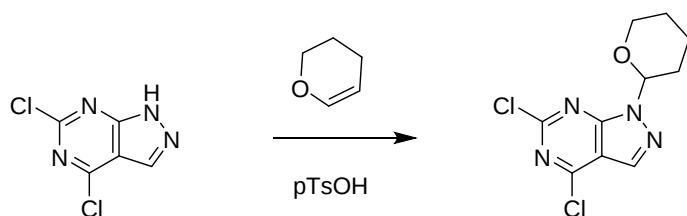
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

2-Theta	d(Å)	Área	A%
7,61	11,60	182.433	39,1
10,33	8,56	128.795	27,6
11,25	7,86	13.807	3
12,71	6,96	102.263	21,9
13,23	6,69	34.318	7,4
13,66	6,48	86.861	18,6
13,90	6,37	60.997	13,1
15,02	5,89	53.064	11,4
15,27	5,80	166.039	35,6
15,88	5,58	163.970	35,2
16,33	5,42	87.102	18,7
16,76	5,29	364.312	78,2
17,90	4,95	346.920	74,4
18,26	4,85	105.152	22,6
20,67	4,29	465.993	100
21,37	4,16	104.882	22,5
21,92	4,05	69.905	15
22,31	3,98	133.265	28,6
22,90	3,88	42.178	9,1
23,22	3,83	20.810	4,5
23,61	3,76	39.278	8,4
24,74	3,60	160.353	34,4
25,78	3,45	67.865	14,6
26,23	3,40	30.059	6,5
26,73	3,33	120.802	25,9
27,57	3,23	17.553	3,8
29,10	3,07	75.111	16,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

29,39	3,04	97.911	21
30,72	2,91	66.141	14,2
30,94	2,89	71.606	15,4
31,69	2,82	14.912	3,2
32,06	2,79	33.582	7,2
33,76	2,65	16.247	3,5
34,35	2,61	18.479	4

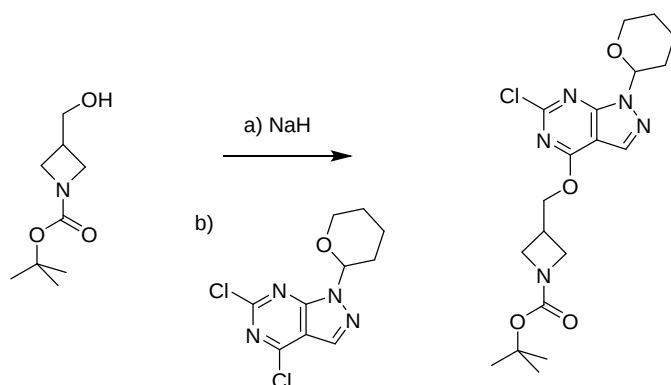
Preparación 11: 4,6-dicloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina



Se añadió 4,6-dicloro-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina (2,50 g, 13,23 mmol) a un matraz y se disolvió en 1,4-dioxano (52,9 mL). Luego, se añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (pTsOH, 0,25 g, 1,32 mmol) a la solución transparente de color amarillo pálido seguido de 3,4-dihidro-2h-pirano (1,8 mL, 19,84 mmol) y la reacción se calentó hasta 40 °C y se agitó durante la noche. Luego, la mezcla resultante se enfrió y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente del 0-100% de EtOAc:hexanos al para obtener 4,6-dicloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina (2,6 g, 9,52 mmol, 72,0% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₀H₁₀Cl₂N₄O 274,0 hallado 188,9 (pérdida de fragmento THP).

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

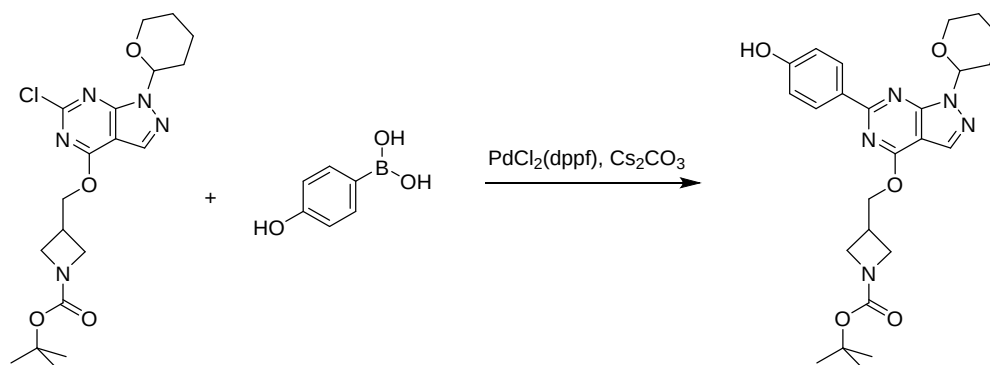
Preparación 12: terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato



A un matraz seco de base redonda, se le agregó 1-boc-azetidina-3-il-metanol (1,96 g, 10,47 mmol) y se disolvió en DMF (20,0 mL). La solución de agitación se enfrió hasta 0 °C y luego se agregó hidruro de sodio (0,762 g, 19,04 mmol). La reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos, lo que dio como resultado una mezcla espumosa de color rosa pálido. La mezcla se enfrió hasta 0 °C y se agregó una solución de 4,6-dicloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d] pirimidina (2,6 g, 9,52 mmol) en DMF (10 mL) mediante una cánula. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. Luego, la reacción se desactivó con 120 mL de H₂O y se extrajo 3 veces con 30 mL de EtOAc. Luego, la solución orgánica se lavó 3 veces con 100 mL de solución de salmuera:H₂O (1:1). La solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un aceite de color amarillo pálido. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente del 0-50% de EtOAc:hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (1,95 g, 4,60 mmol, 48% de rendimiento).

Preparación 13: terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

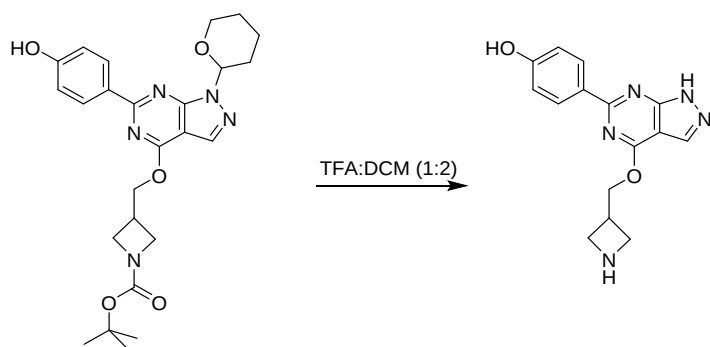
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



En un matraz de base redonda, se disolvió terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (1,95 g, 4,60 mmol) en 1,4-dioxano (23,0 mL). Se agregó ácido 4-hidroxifenilborónico (0,95 g, 6,90 mmol) seguido por agua (7,7 mL). Se agregó dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (0,56 g, 0,69 mmol) y el matraz se equipó con un condensador de reflujo, se colocó bajo nitrógeno, se calentó hasta 110 °C, y se agitó durante la noche. Luego, la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y el solvente orgánico se eliminó a vacío. Se añadió H₂O (20 mL) al residuo y se extrajo tres veces con DCM (30 mL). La solución orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un aceite negro. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente del 0-100% de EtOAc:hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (2,03 g, 4,22 mmol, 92% de rendimiento) como un aceite amarillo/naranja. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₁N₅O₅ 482,2 hallado 482,2.

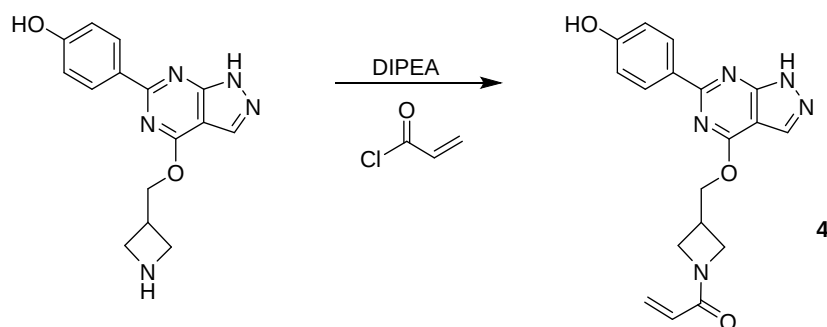
Preparación 14: 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)fenol

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



En un matraz de base redonda, se disolvió terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (2,03 g, 4,22 mmol) en DCM (10,0 mL) y se agregó lentamente TFA (5,0 mL) a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 18 horas para obtener una solución naranja/púrpura. La reacción se concentró al vacío para producir un sólido gris/naranja. El compuesto base se aisló como sal de TFA con un rendimiento del 100% (1,25 g, 4,22 mmol). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₁₅N₅O₂ 298,1 hallado 298,3.

Ejemplo 4: 1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-il)prop-2-en-1-ona

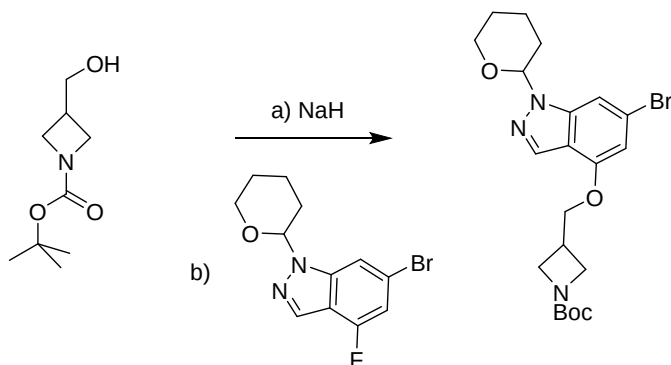


En un matraz de base redonda, se disolvió ácido 4-(4-(azetidina-3-ilmetoxi)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)fenol trifluoroacético (1,25 g, 4,20 mmol) en DMF (21,0 mL) y se agregó diisopropiletilamina (3,67 mL, 21,0 mmol). La reacción se enfrió hasta 0 °C y se agitó durante 5 minutos antes de agregar lentamente cloruro de acrililo (0,273 mL, 3,36 mmol), y luego se agitó durante

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

15 minutos a 0 °C. La reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se concentró al vacío. El producto crudo se disolvió en 1:1 MeCN:H₂O y se purificó en HPLC preparatoria de fase inversa con un gradiente del 20-80% de MeCN:H₂O. Las fracciones deseadas se combinaron y liofilizaron para obtener el compuesto base (434 mg, 1,235 mmol, 29% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₇N₅O₃ 352,1 hallado 352,2. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,32 – 8,23 (d appt, 2H), 8,07 (s, 1H), 6,89 – 6,81 (d appt, 2H), 6,30 (dd, *J* = 17,0, 10,3 Hz, 1H), 6,07 (dd, *J* = 17,0, 2,3 Hz, 1H), 5,63 (dd, *J* = 10,3, 2,3 Hz, 1H), 4,81 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 4,36 (t, *J* = 8,6 Hz, 1H), 4,12 (dd, *J* = 8,6, 5,4 Hz, 1H), 4,06 (t, 1H), 3,82 (dd, *J* = 10,2, 5,5 Hz, 1H), 3,24 – 3,10 (m, 1H).

Preparación 15: terc-butilo 3-(((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

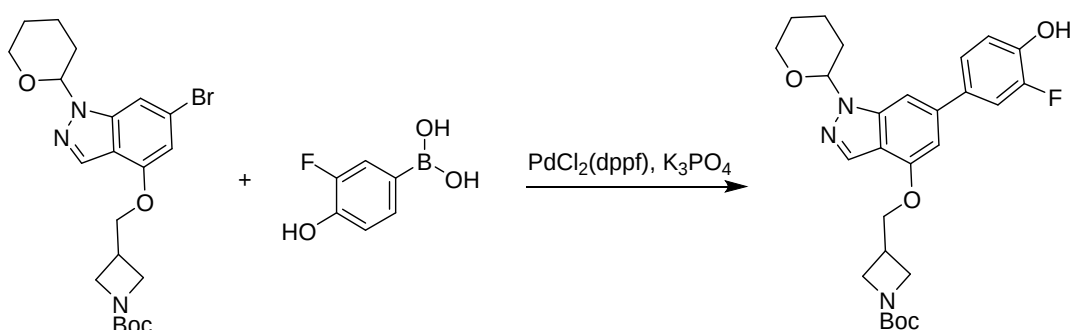


Se añadió 1-boc-azetidina-3-il-metanol (3,44 g, 18,39 mmol) a un matraz secado al horno y se disolvió en DMF (41,8 mL). La solución se enfrió hasta 0 °C y se agitó durante 10 minutos antes de agregar hidruro de sodio (0,50 g, 20,89 mmol). La mezcla espumosa se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Luego, la reacción se enfrió hasta 0 °C y se agregó una solución de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (2,5 g, 8,36 mmol) en DMF (10 mL) mediante una cánula. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1,5 horas. La reacción se desactivó agregando 120 mL de H₂O y se extrajo 3 veces con 50 mL de EtOAc. La fase orgánica se combinó y se lavó 3 veces con 100 mL de solución de salmuera:H₂O (1:1). Luego, la fase orgánica se recogió y secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

concentró para obtener un aceite transparente de color amarillo pálido (3,9 g, 8,36 mmol). El producto crudo se utilizó sin ninguna purificación adicional. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₈BrN₃O₄ 466,14 hallado 466,1.

Preparación 16: terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

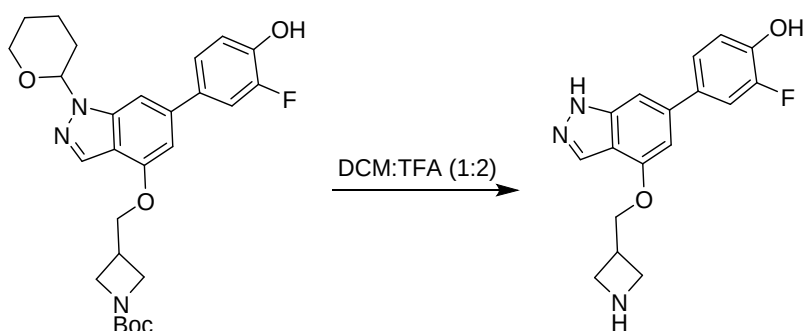


Se agregó terc-butilo 3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (3,9 g, 8,36 mmol) a un matraz y se disolvió en 1,4-dioxano (44,6 mL). Se agregó ácido 3-fluoro-4-hidroxifenilborónico (1,96 g, 12,54 mmol) seguido por agua (11,2 mL) y fosfato de potasio, tribásico (5,33 g, 25,09 mmol). Se agregó dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio (1,02 g, 1,25 mmol) y el matraz se equipó con un condensador de reflujo y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se calentó hasta 110 °C y se agitó durante 18 horas. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el solvente orgánico se eliminó al vacío para producir un aceite negro. Al aceite, se le añadieron 10 mL de H₂O y la solución se extrajo 3 veces con 40 mL de DCM. La solución orgánica se recogió y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta obtener un aceite negro. El aceite se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente del 0-100% de EtOAc:Hex para obtener terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(2,58 g, 5,19 mmol, 62% de rendimiento) como un aceite transparente de color amarillo. (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₃₂FN₃O₅ 498,2 hallado 498,2.

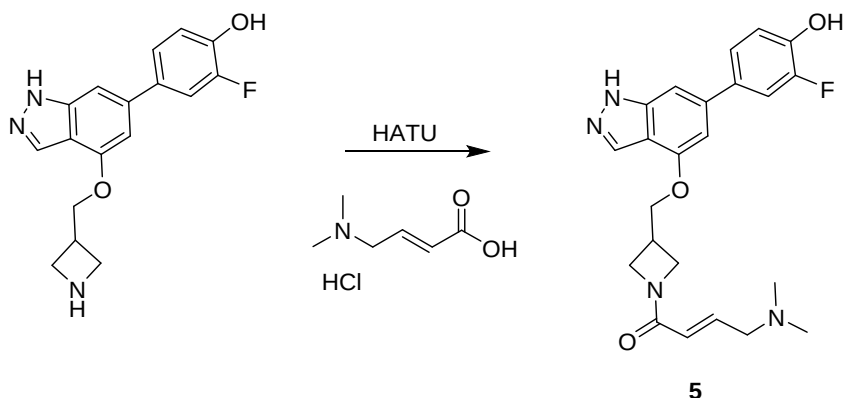
Preparación 17: 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)-2-fluorofenol



En un matraz de base redonda de 50 mL, se disolvió terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (2,58 g, 5,19 mmol) en DCM (10,0 mL). Se agregó TFA (5,00 mL) lentamente a la solución transparente de color amarillo a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 24 horas y la solución resultante de color amarillo oscuro/púrpura se concentró al vacío para obtener la sal de TFA de 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)-2-fluorofenol (3,46 g) como un sólido color gris/amarillo (100% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₁₆FN₃O₂ 314,1 hallado 314,2.

Ejemplo 5: (E)-4-(dimetilamino)-1-(3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxyifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-ona

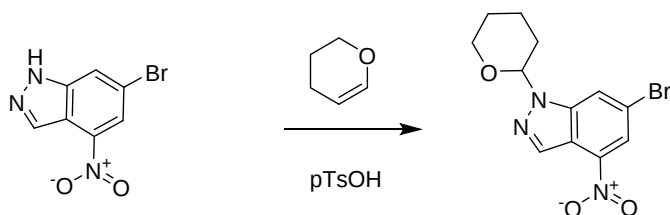
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregaron ácido (2E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (464 mg, 2,80 mmol) y HATU (976 mg, 2,57 mmol) a un matraz de base redonda, se disolvieron en DMF (5,5 mL) y se agitaron durante 15 minutos. Luego, una solución de 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)-2-fluorofenol (1,0 g, 2,34 mmol) en DMF (5,5 mL) se agregó lentamente a la reacción de agitación, seguida por diisopropiletilamina (2,0 mL, 11,70 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas y luego se concentró al vacío. El producto crudo se disolvió en 1:1 MeCN:H₂O y se purificó en HPLC preparatoria de fase inversa con un gradiente del 20-80% de MeCN:H₂O. Las fracciones deseadas se combinaron y se liofilizaron para obtener la sal de TFA del compuesto base (271 mg, 0,50 mmol, 21% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₅FN₄O₃ 425,2 hallado 425,2. ¹H RMN (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7,94 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H), 7,39 (dd, *J* = 12,5, 2,2 Hz, 1H), 7,35 – 7,28 (m, 1H), 7,24 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H), 7,03 – 6,93 (m, 1H), 6,80 – 6,68 (m, 2H), 6,53 (dt, *J* = 15,2, 1,1 Hz, 1H), 4,53 (t, *J* = 8,7 Hz, 1H), 4,47 – 4,34 (m, 2H), 4,35 – 4,22 (m, 2H), 4,09 (dd, *J* = 10,8, 5,6 Hz, 1H), 3,93 (dd, *J* = 7,2, 1,1 Hz, 2H), 3,27 – 3,19 (m, 1H), 2,88 (s, 6H).

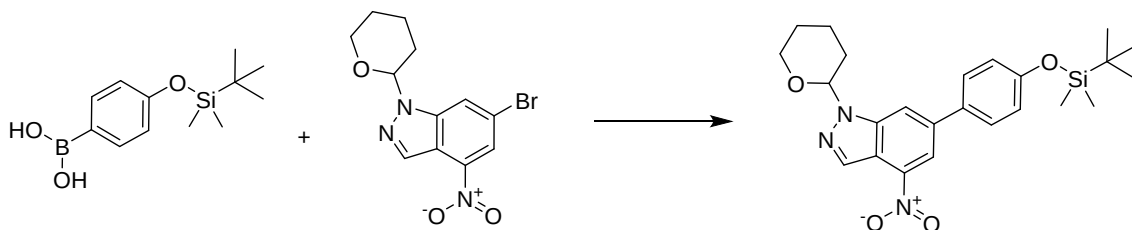
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 18: 6-Bromo-4-nitro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol



Se agitó una mezcla de 6-bromo-4-nitro-1H-indazol (3,00 g, 12,4 mmol), 3,4-dihidro-2H-pirano al 97% (3,40 mL, 37,2 mmol) y ácido p-toluenesulfónico monohidrato (pTsOH, 0,236 g, 1,24 mmol) en DCM (41,3 mL) a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se filtró a través de una almohadilla de celita y se concentró. Se supuso que la reacción tenía una conversión del 100% (4,05 g) y se llevó a la reacción posterior sin purificación adicional.

Preparación 19: 6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-4-nitro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol

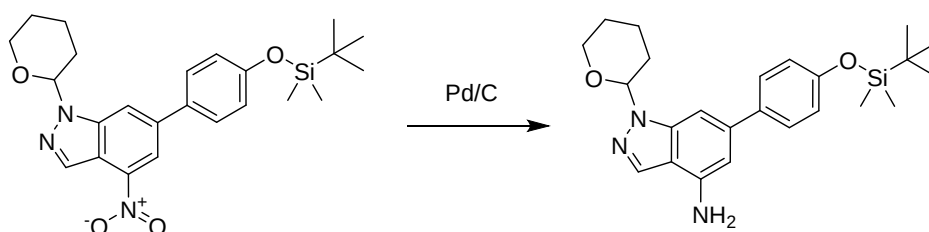


Una mezcla de 6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-4-nitro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (1,00 g, 3,07 mmol), ácido 4-(terc-butildimetilsililoxi)fenilborónico (1,16 g, 4,60 mmol), y fosfato de potasio tribásico (1,30 g, 6,13 mmol) en dioxano (14,9 mL) y H₂O (4,98 mL) se purgó con N₂ durante 10 min. Luego, se agregó [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaldio(II) (0,224 g, 0,307 mmol) y luego se selló el matraz. La reacción se calentó hasta 110 °C y se agitó durante 1 hora. Después de confirmada la conversión completa al producto deseado mediante LCMS, la reacción se desactivó con 20 mL de H₂O y 20 mL de EtOAc. Ambas capas se filtraron a través de una almohadilla de celita y se transfirieron a un embudo separador. La mezcla se extrajo 3 veces con 20 mL de EtOAc, y la capa acuosa se desechó. Las fracciones orgánicas combinadas se concentraron y

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

posteriormente se purificaron por cromatografía de columna flash con un gradiente del 0-10% de EtOAc:hexanos. El producto se aisló puro como un aceite color amarillo pálido (1,03 g, 74,4% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₃₁N₃O₄Si 454,61 hallado 454,3.

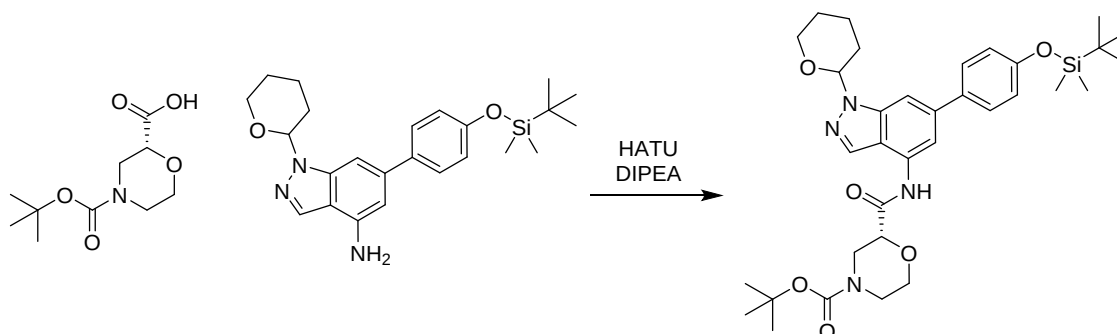
Preparación 20: 6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-amina



Se disolvieron 6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-4-nitro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (0,980 g, 2,16 mmol) y paladio al 10% en peso de carbono (húmedo) (0,980 g) en THF (2,8 mL) y alcohol isopropílico (11,2 mL). El recipiente de reacción se volvió a llenar con N₂ durante 5 minutos y luego se selló y se colocó bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de que LCMS indicara la conversión completa al producto deseado, la mezcla de reacción se filtró. Luego se lavó el filtro con THF adicional. Después de concentrar y purificar el producto mediante cromatografía de columna flash (40 g) con un gradiente del 0-25% de EtOAc:hexanos, se aisló (0,562 g, 61,5% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₃₃N₃O₂Si 424,63 hallado 424,4.

Preparación 21: terc-butilo (2R)-2-((6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)carbamoil)morfolina-4-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

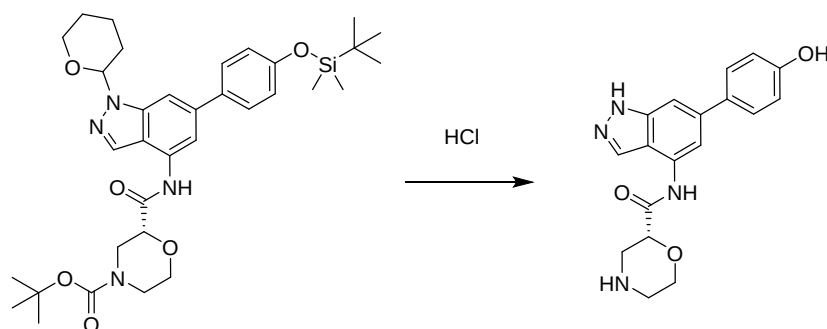


Se disolvieron ácido (R)-N-boc-2-morfolinecarboxílico (0,819 g, 3,54 mmol) y 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido de hexafluorofosfato (HATU, 2,69 g, 7,08 mmol) en DMF (11,8 mL) y se dejaron agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó 6-((4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-amina (1,00 g, 2,36 mmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. LCMS indicó la conversión completa al producto deseado. La reacción se desactivó con 10 mL de H₂O y 10 mL de DCM. Después de la Transferencia a un embudo separados, la mezcla se extrajo tres veces con 10 mL de DCM y la capa acuosa se desechó. Las fracciones orgánicas combinadas se concentraron y posteriormente se purificaron por cromatografía de columna flash (40 g) con un gradiente del 0-45% de EtOAc:hexanos. Los productos se aislaron como un aceite color amarillo pálido (1,01 g, 67% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₃₄H₄₈N₄O₆Si 637,87 hallado 637,6.

HH

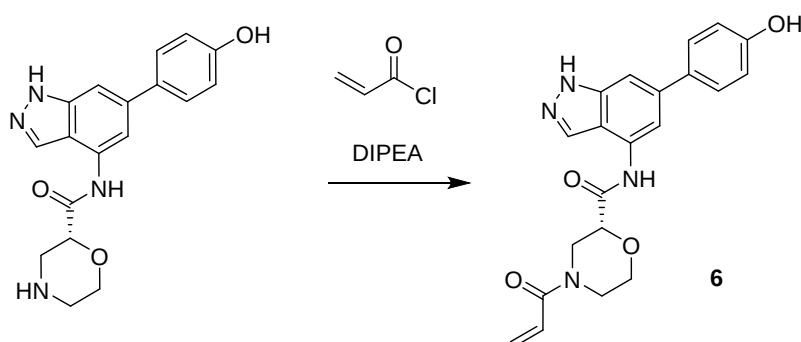
Preparación 22: (R)-N-(6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)morfolina-2-carboxamida

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se disolvió terc-butilo (2R)-2-((6-(4-((terc-butildimetilsilil)oxi)fenilo)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)carbamoyl)morfolina-4-carboxilato (1,00 g, 1,58 mmol) en MeOH (2,0 mL). Mientras se agitaba, se añadió lentamente una solución de HCl en dioxano 4,0 M (12,1 mL, 48,5 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 60 °C y se agitó durante 30 minutos, después de lo cual la LCMS indicó la conversión completa al producto deseado. La mezcla se concentró para obtener el producto como un aceite naranja. Se supuso que la reacción tenía una conversión del 100% (0,533 g) y se llevó a la reacción posterior sin purificación adicional.

Ejemplo 6: (R)-4-acriloil-N-(6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)morfolina-2-carboxamida

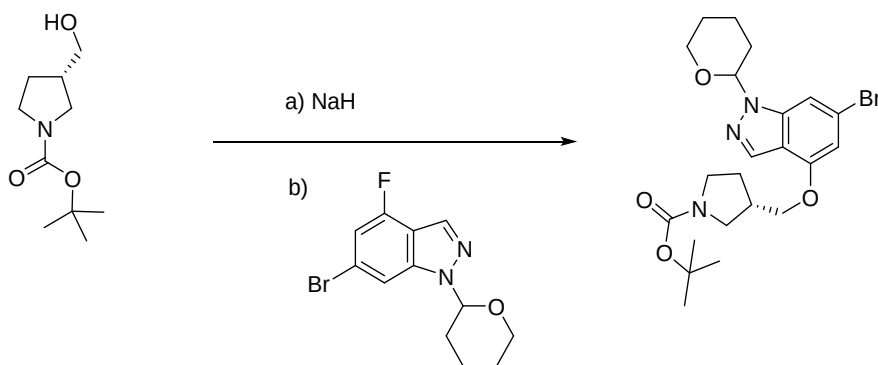


Se disolvió (R)-N-(6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)morfolina-2-carboxamida (0,533 g, 1,58 mmol) en DMF (7,9 mL). Se agregó N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 2,75 mL, 15,8 mmol) y luego se agregó lentamente

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

cloruro de acrililo (0,0900 mL, 1,10 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que la conversión se monitoreara mediante LCMS. Después de que se indicara la conversión completa mediante LCMS, la mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante preparación con HPLC de fase inversa con un gradiente del 10-50% de ACN: H₂O. Se recogieron fracciones del producto deseado y se concentraron mediante liofilización. El producto se aisló (130 mg, 21% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₀N₄O₄ 393,42 hallado 393,4. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 8,13 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 7,51 (s, 1H), 6,91 (dd, *J* = 8,7, 2,9 Hz, 3H), 6,30 (dt, *J* = 16,8, 2,3 Hz, 1H), 5,84 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H), 4,45 – 4,25 (m, 2H), 4,21 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 4,12-4,02 (m, 1H), 3,78 (t, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,53 (m, 1H), 3,29 – 2,99 (m, 1H).

Preparación 23: terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato

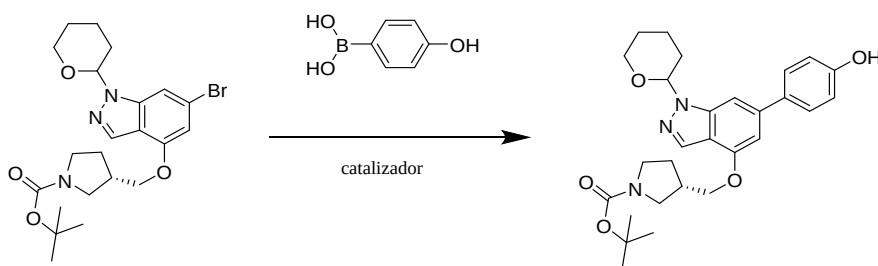


Se agregó hidruro de sodio (0,072 g, 3,01 mmol) a una solución de (Ss)-N-boc-pirrolidina-3-metanol (0,444 g, 2,21 mmol) en DMF (6 mL) bajo una atmósfera de N₂ a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se agregó 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (0,600 g, 2,01 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió agua (1 mL) y la reacción se concentró al vacío. El material crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 40% en hexanos para obtener terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(0,964 g, 1,87 mmol, 93% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{22}H_{30}BrN_3O_4$ 480,15 hallado 480,1.

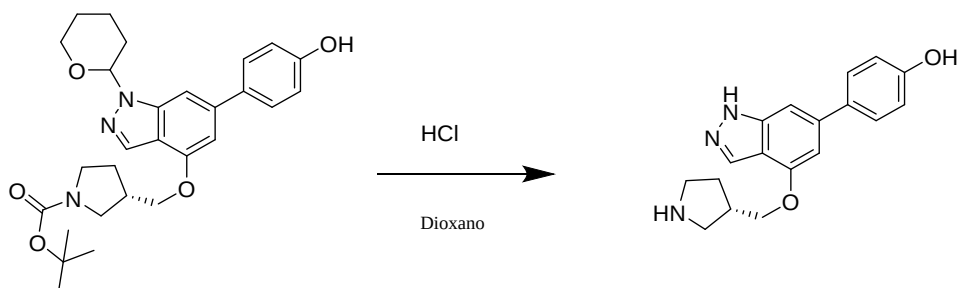
Preparación 24: terc-butilo (3S)-3-(((6-(4-hidroxifenil-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato



Se agregó acetato de paladio (0,084 g, 0,375 mmol) a una solución de ácido 4-hidroxifenilborónico (0,388 g, 2,81 mmol), terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (0,900 g, 1,87 mmol), 1,1'-bis(di-t-butilfosfino)ferroceno (0,178 g, 0,375 mmol) y fosfato de potasio (1,193 g, 5,62 mmol) en 1,4-dioxano (12 mL) y agua (3,00 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa de cloruro de amonio (10 mL) y la mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3×10 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 50% en hexanos para obtener terc-butilo (3S)-3-(((6-(4-hidroxifenil-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (0,800 g, 1,62 mmol, 87% de rendimiento) como un líquido transparente de color amarillo. (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{28}H_{35}N_3O_5$ 494,27 hallado 494,2.

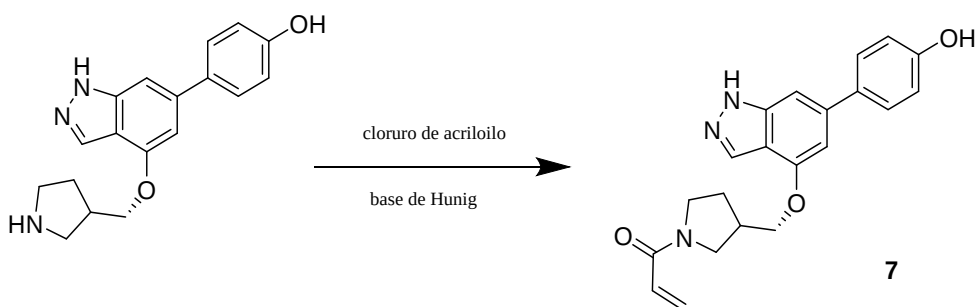
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 25: (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol



Se agregó HCl 4,0N en dioxano (8,10 mL, 32,4 mmol) a una solución de terc-butilo (3S)-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (0,800 g, 1,62 mmol) en dioxano (6 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para producir (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol como una sal de HCl (0,501 g, 1,62 mmol, 100% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₉N₃O₂ 310,16 hallado 310,3.

Ejemplo 7: (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona

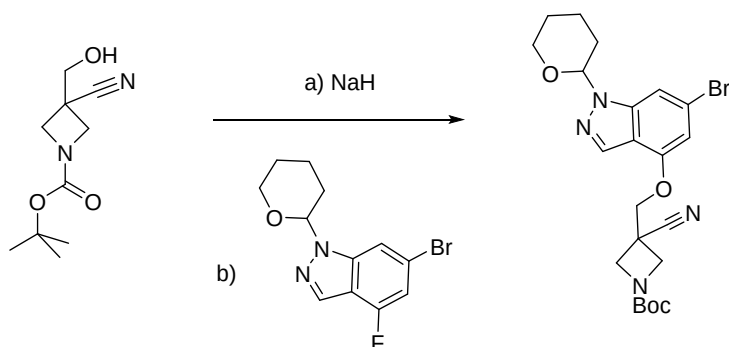


Se agregó N,N-diisopropiletilamina (2,83 mL, 16,2 mmol) a una solución de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-indazol-6-il)fenol HCl sal (0,560 g, 1,62 mmol) en DMF (5 mL) a 0 °C, seguida por cloruro de acrililo (0,171 mL, 2,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos luego se concentró a un volumen de aproximadamente 2 mL. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 30-90% en agua con ácido

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (226 mg, 0,473 mmol, 29,2% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₁N₃O₃ 364,17 hallado 364,2. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,00 (s, 1H), 10,31 (s, 1H), 8,04-7,94 (m, 1H), 7,59-7,48 (m, 1H), 7,18 (s, 1H), 6,89-6,79 (m, 1H), 6,76-6,70 (m, 1H), 6,65-6,54 (m, 1H), 6,13 (dd, J = 16,6, 1,7 Hz, 1H), 5,69-5,62 (m, 1H), 4,25-3,78 (m, 4H), 3,76-3,28 (m, 2H), 2,88-2,63 (m, 1H), 2,22-1,72 (m, 2H).

Preparación 26: terc-butilo 3-(2(((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato

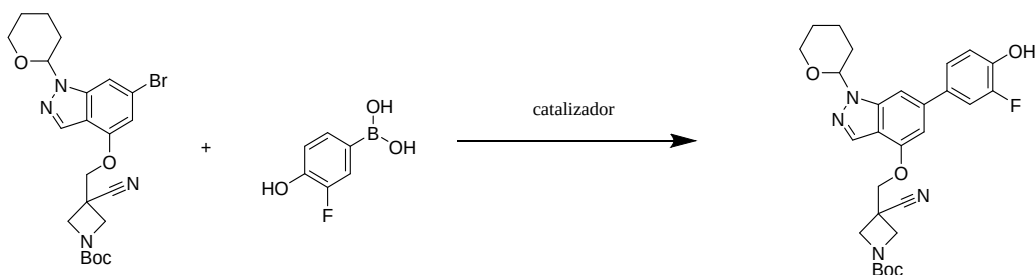


A un vial de centelleo seco purgado con N₂, se agregó terc-butilo 3-ciano-3-(hidroximetilo)azetidina-1-carboxilato (851 mg, 4,01 mmol), se disolvió en 5 mL de DMF y la solución se enfrió hasta 0 °C. Se agregó lentamente hidruro de sodio al 60% por peso en aceite mineral (267 mg, 6,69 mmol) a la solución de agitación y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente después de la adición. La reacción espumosa se agitó durante 30 minutos antes de enfriarse nuevamente hasta 0 °C. Se añadió lentamente una solución de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (800 mg, 2,67 mmol) en 2 mL de DMF al vial de centelleo que contenía la solución de organosodio. Después de la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, luego de lo cual LCMS indicó la conversión completa del material de partida al producto deseado. La reacción se desactivó agregando lentamente 2 mL de H₂O y 2 mL de EtOAc, lo cual se dejó agitar durante 5 minutos. La solución bifásica se transfirió luego a un embudo separador y se agregaron 10 mL adicionales de H₂O. La mezcla se extrajo 3 veces con 20 mL de EtOAc, y la capa acuosa se

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

desechó. Luego, las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con 3×10 mL de H_2O :salmuera 1:1 para eliminar el DMF residual. Luego, la solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró hasta obtener un aceite ligeramente amarillo. El aceite luego se purificó mediante la cromatografía flash en columna usando un gradiente de 0% a 40% EtOAc:hexanos. El producto se aisló puro como un aceite transparente, incoloro y viscoso (1,096 g, 83% de rendimiento). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BrN}_4\text{O}_4$ 491,13 hallado 491,1.

Preparación 27: terc-butilo 3-ciano-3(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

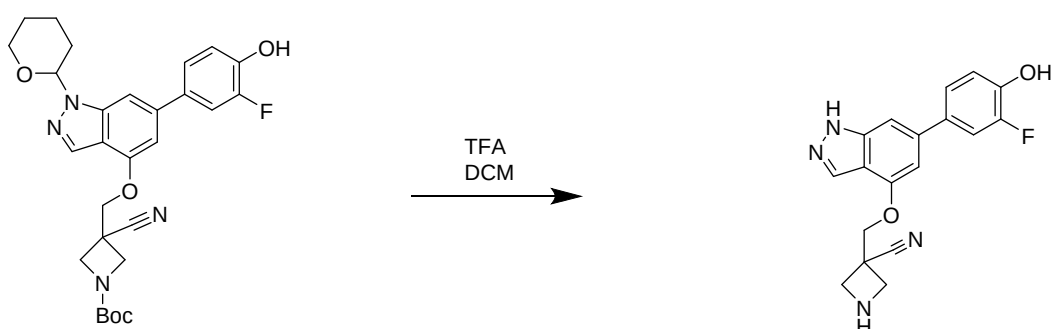


Se agregó una mezcla 1:1 de acetato de paladio (25,1 mg, 0,112 mmol) y 1,1'-Bis(di-*t*-butilfosfino)ferroceno al 98% (53,1 mg, 0,112 mmol) a una solución de ácido 3-fluoro-4-hidroxibencenoborónico (262 mg, 1,679 mmol), terc-butilo 3-(2-(((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (550 mg, 1,119 mmol), y fosfato de potasio (713 mg, 3,36 mmol) en 1,4-dioxano (4,5 mL) y agua (1 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2×5 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 40% en hexanos para obtener terc-butilo 3-ciano-3(((6-(3-fluoro-4-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (267 mg, 0,511 mmol, 46% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{28}H_{31}FN_4O_5$ 523,24 hallado 523,4.

Preparación 28: 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-3-carbonitrilo

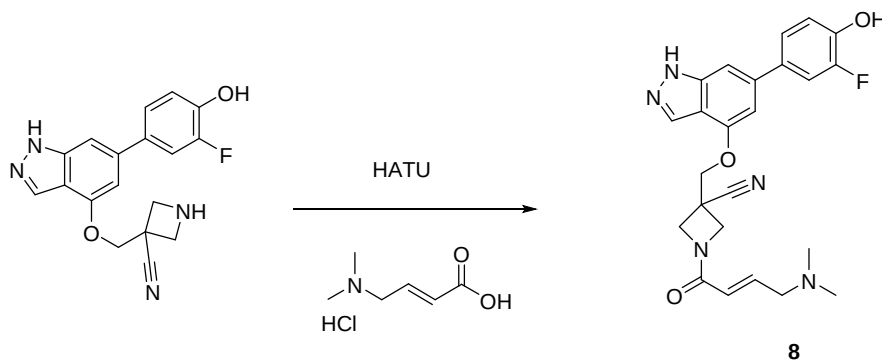


Se disolvió terc-butilo-3-ciano-3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (267 mg, 0,511 mmol) en diclorometano (1 mL) y se agregó lentamente TFA (1 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, luego de lo cual, la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La reacción se concentró para proporcionar 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

il)oxi)metilo)azetidina-3-carbonitrilo como sal de TFA (100% de rendimiento).
 (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₅FN₄O₂ 339,13 hallado 339,2.

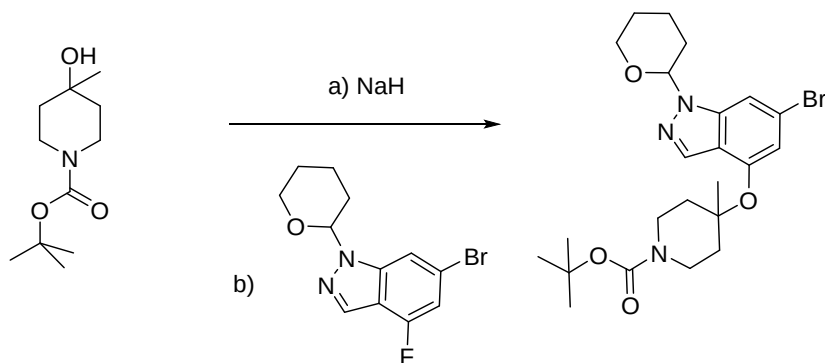
Ejemplo 8: (E)-1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)-3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-3-carbonitrilo



Se agregó HATU hexafluorofosfato de (2-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio, 121 mg, 0,318 mmol) a una solución de clorhidrato de ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (41,1 mg, 0,318 mmol) en DMF (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se agregó la sal de TFA 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-3-carbonitrilo (160 mg, 0,354 mmol), seguida por DIPEA (0,618 mL, 3,54 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna Zorbax Bonus-RP (2,1 x 30 mm, 1,8 micrones) a escala preparatoria con acetonitrilo al 15-75% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener yield (E)-1-(4-(dimetilamino)but-2-enoil)-3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)azetidina-3-carbonitrilo (56,2 mg, 0,121 mmol, 34% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₄FN₅O₃ 450,19 hallado 450,0. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) □□9,94 (s, 1H), 9,77 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,47 (dd, *J* = 12,8, 2,2 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J* = 8,4, 1,7 Hz, 1H), 7,22 (s, 1H), 6,99 – 6,90 (m, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,59 – 6,48 (m, 1H), 6,31 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 4,67 – 4,60 (m, 3H), 4,40 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 4,27 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 4,12 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,78 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,66 (s, 6H).

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 29: terc-butilo 4-((6-bromo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidina-1-carboxilato

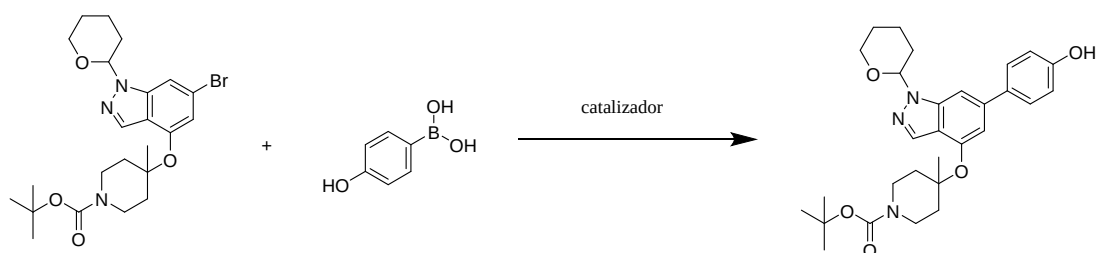


A un vial de centelleo seco purgado con N_2 , se agregó 1-boc-4-metilpiperidin-4-ol (567 mg, 2,63 mmol), se disolvió en 3 mL de DMF y la solución se enfrió hasta 0 °C. Se agregó lentamente hidruro de sodio al 60% en peso en aceite mineral (175 mg, 4,39 mmol) a la solución de agitación y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente después de la adición. La reacción espumosa se agitó durante 30 minutos antes de enfriarse nuevamente hasta 0 °C. Se añadió lentamente una solución de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (525 mg, 1,755 mmol) en 1 mL de DMF al vial de centelleo que contenía la solución de organosodio. Después de la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, luego de lo cual LCMS indicó la conversión completa del material de partida al producto deseado. La reacción se desactivó agregando lentamente 2 mL de H_2O y 2 mL de EtOAc, lo cual se dejó agitar durante 5 minutos. La solución bifásica se transfirió luego a un embudo separador y se agregaron 10 mL adicionales de H_2O . La mezcla se extrajo 3 veces con 20 mL de EtOAc, y la capa acuosa se desechó. Luego, las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con 3×10 mL de H_2O :salmuera 1:1 para eliminar el DMF residual. Luego, la solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró hasta obtener un aceite ligeramente amarillo. El aceite luego se purificó mediante la cromatografía flash en columna usando un gradiente de 0% a 40% EtOAc:hexanos. El producto se

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

aisló puro como un aceite transparente, incoloro y viscoso (389 mg, 45% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₂BrN₃O₄ 494,17 hallado 494,4.

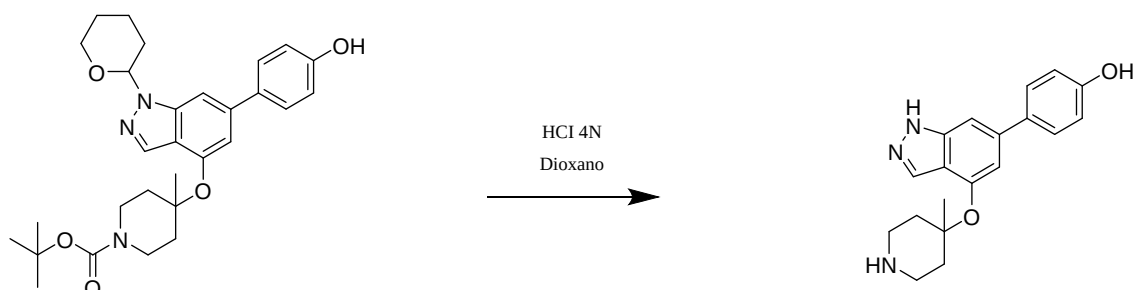
Preparación 30: terc-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidina-1-carboxilato



Se agregó una mezcla 1:1 de acetato de paladio (9,1 mg, 0,040 mmol) y 1,1'-Bis(di-*t*-butilfosfino)ferroceno al 98% (19,2 mg, 0,040 mmol) a una solución de ácido 4-hidroxibencenoborónico (42 mg, 0,30 mmol), terc-butilo 4-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidina-1-carboxilato (100 mg, 0,202 mmol), y fosfato de potasio, tribásico al 97%, anhidro (129 mg, 0,607 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL) y agua (0,5 mL). Se desgasificó la mezcla de reacción con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 × 5 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna combiflash (12 g) con acetato de etilo al 40% en hexanos para obtener terc-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato (96 mg, 0,189 mmol, 94% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado C₂₉H₃₇N₃O₅ 508,28 hallado 508,3.

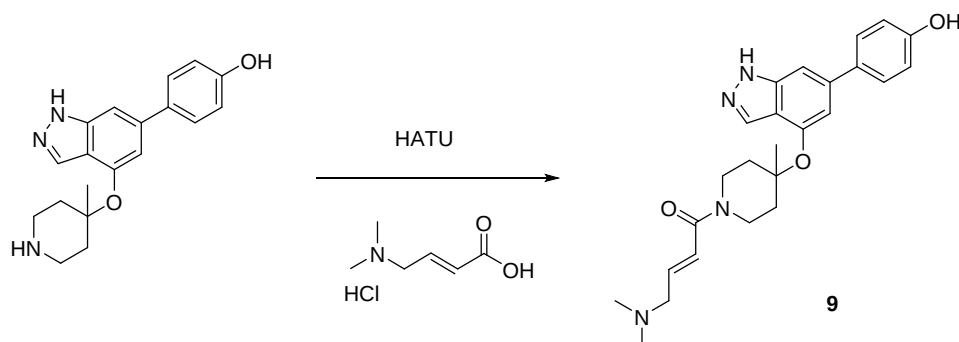
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 31: 4-(4-((4-metilpiperidin-4-il)oxi)-1H-indazol-6-il)fenol



Se disolvió terc-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidina-1-carboxilato (96 mg, 0,189 mmol) en 1,4-dioxano (1 mL) y se agregó lentamente HCl 4N en 1,4-dioxano (1,18 mL, 4,73 mmol). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, luego de lo cual, la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La reacción se concentró para proporcionar 4-(4-((4-metilpiperidin-4-il)oxi)-1H-indazol-6-il)fenol como sal de HCl (100% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado $C_{19}H_{21}N_3O_2$ 324,17 hallado 324,3.

Ejemplo 9: (E)-4-(dimetilamino)-1-(4-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidin-1-il)but-2-en-1-ona

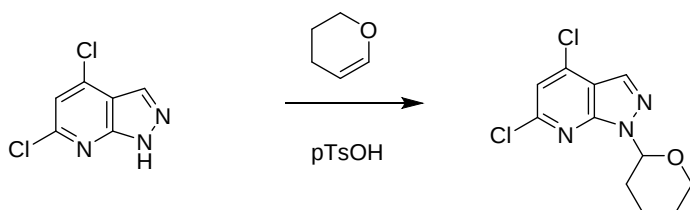


Se agregó HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio hexafluorofosfato, 72 mg, 0,189 mmol) a una solución de clorhidrato de ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (24 mg, 0,186 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se agregó 4-(4-((4-metilpiperidin-4-il)oxi)-1H-indazol-6-il)fenol, sal de HCl

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(68,0 mg, 0,189 mmol), seguida por DIPEA (0,330 mL, 1,890 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna Zorbax Bonus-RP (2,1 x 30 mm, 1,8 micrones) a escala preparatoria con acetonitrilo al 5-65% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (E)-4-(dimetilamino)-1-(4-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)-4-metilpiperidin-1-il)but-2-en-1-ona (39,0 mg, 0,063 mmol, 34% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₅H₃₀FN₄O₃ 435,24 hallado 435,2. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) □□12,99 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 8,02 (d, *J* = 0,9 Hz, 1H), 7,52 – 7,44 (m, 2H), 7,27 (s, 1H), 6,90 (d, *J* = 15,0 Hz, 1H), 6,86 – 6,78 (m, 3H), 6,58 – 6,47 (m, 1H), 3,99 – 3,86 (m, 1H), 3,83 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,78 – 3,55 (m, 2H), 2,74 (s, 6H), 1,40 (s, 3H).

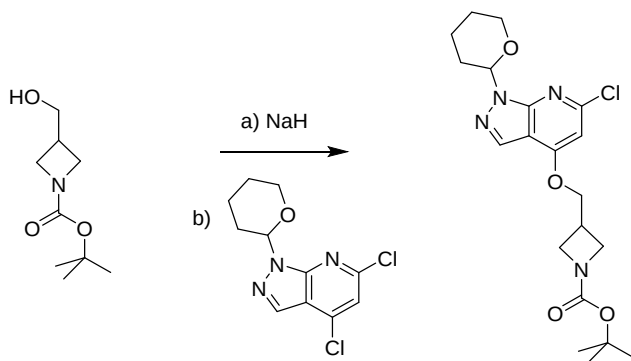
Preparación 32: 4,6-dicloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina



Se agregó 3,4-dihidro-2h-pirano (2,0 g, 24,07 mmol) a una solución de 4,6-dicloro-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (2,50 g, 13,23 mmol) en cloruro de metileno (30 mL), seguido por ácido p-toluenosulfónico monohidrato (0,275 g, 1,60 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó agua (50 mL) y la mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se lavaron con salmuera (1 x 50 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron para obtener un líquido transparente de color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un EtOAc al 10% en hexanos para obtener 4,6-dicloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo [3,4-b]piridina (3,0 g, 11,1 mmol, 67% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₁H₁₁Cl₂N₃O 272,04 hallado 272,21.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

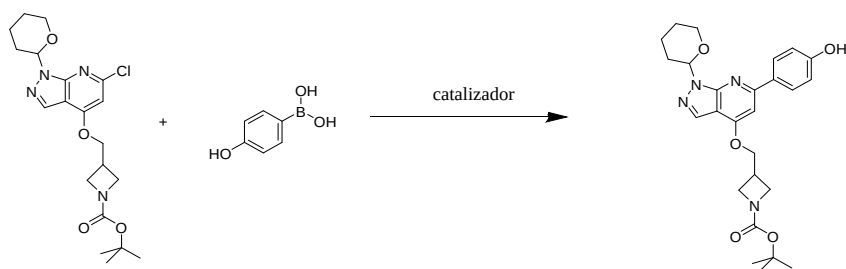
Preparación 33: terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato



Se agregó NaH (60% de dispersión en aceite mineral, 160 mg, 4,0 mmol) a una solución de 1-boc-azetidina-3-il-metanol (760 mg, 4,0 mmol) en DMF (5 mL) y éter dietílico (5 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 15 minutos. Se agregó 4,6-dicloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (1,0 g, 3,7 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a ts durante 1 hora. Se agregó agua (10 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno (3 x 10 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se lavaron con salmuera (1 x 10 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido transparente de color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con EtOAc al 30% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (1,1 g, 2,60 mmol, 70% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₇ClN₄O₄ 423,18 hallado 423,25.

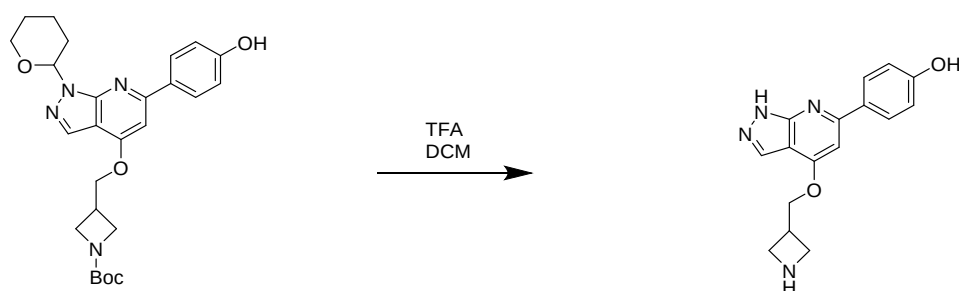
Preparación 34: terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó una solución de carbonato de sodio (500 mg, 4,72 mmol) en agua (4 mL) a ácido 4-hidroxifenilborónico (392 mg, 2,84 mmol) y terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (1,0 g, 2,36 mmol) en dioxano (20 mL) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregó $\text{PdCl}_2(\text{dppf}) \cdot \text{DCM}$ (196 mg, 0,24 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó aún más durante 5 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se filtró a través de un lecho de celita. El material filtrado se lavó con cloruro de metileno y los filtrados se combinaron y lavaron con agua (1 x 10 mL) y salmuera (1 x 10 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido transparente de color marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con EtOAc al 50% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (1,02 g, 2,12 mmol, 76% de rendimiento). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5$ 481,25 hallado 481,65.

Preparación 35: 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol

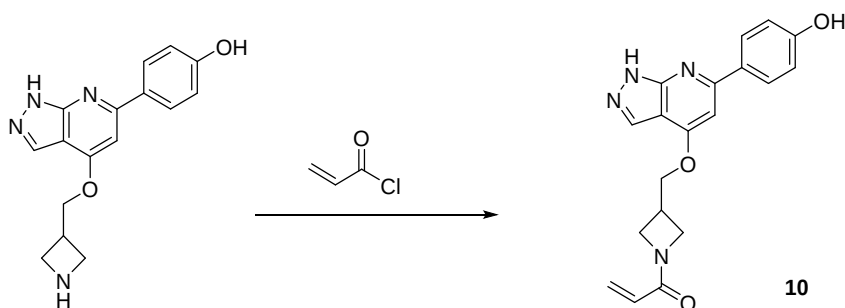


Se agregó lentamente TFA (4,0 mL) a una solución de terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (500 mg, 1,04 mmol) en cloruro de metileno (10 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el sólido resultante se trituró con metanol:cloruro de metileno al 5% para obtener el compuesto base como sal de TFA (330 mg, 0,804 mmol, 77% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₁₆N₄O₂ 297,14 hallado 297,15.

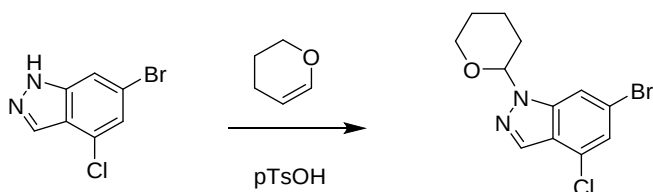
Ejemplo 10: 1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-il)prop-2-en-1-ona



A una solución de 4-(4-(azetidin-3-ilmetoxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol, sal de TFA (35,5 mg, 0,087 mmol) en DMF (1 mL) se agregó DIPEA (0,151 mL, 0,865 mmol), seguida por la adición de cloruro de acrililoilo (7,0 uL, 0,087 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna Zorbax Bonus-RP (2,1 x 30 mm, 1,8 micrones) a escala preparatoria con acetonitrilo al 5-75% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener 1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-il)prop-2-en-1-ona (13,4 mg, 0,028 mmol, 33% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₂₈N₄O₃ 351,15 hallado 351,1. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) □□□□□□ (s, 1H), 9,80 (s, 1H), 7,98 (d, *J* = 8,9 Hz, 3H), 7,13 (s, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,32 (dd, *J* = 17,0, 10,3 Hz, 1H), 6,09 (dd, *J* = 17,0, 2,3 Hz, 1H), 5,64 (dd, *J* = 10,3, 2,3 Hz, 1H), 4,55 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,38 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,15 – 4,02 (m, 2H), 3,80 (dd, *J* = 10,0, 5,4 Hz, 2H), 3,22 – 3,07 (m, 1H).

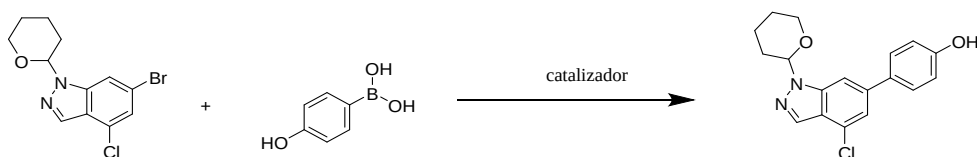
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Preparación 36: 6-bromo-4-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol



Se agregó 3,4-dihidro-2h-pirano (19,79 mL, 216,5 mmol) a una solución de 6-bromo-4-cloro-1H-indazol (10,0 g, 43,3 mmol) en acetato de etilo (200 mL) a 0 °C, seguido por ácido p-toluenosulfónico monohidrato (1,64 g, 8,66 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 4 hora. Se agregó bicarbonato sódico acuoso saturado (100 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua (1 x 100 mL) y salmuera (1 x 100 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron para obtener un sólido de color amarillo. El sólido crudo se purificó mediante trituración en n-pentano para obtener 6-bromo-4-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (13,0 g, 41,2 mmol, 95% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₂H₁₂BrClN₂O 314,99 hallado 314,93.

Preparación 37: 4-(4-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-6-il)fenol

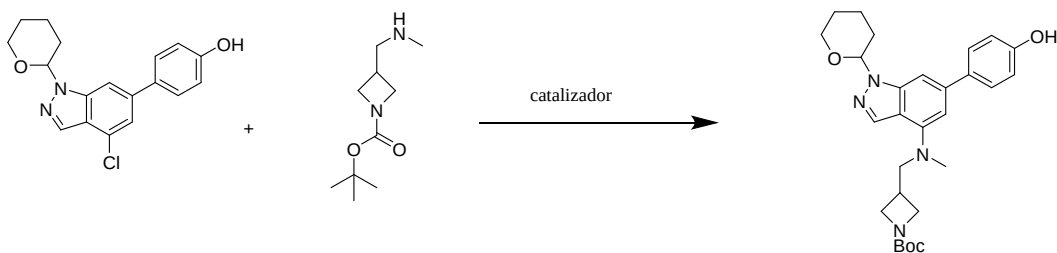


Una solución de carbonato de sodio (8,77 g, 82,8 mmol) a ácido 4-hidroxifenilborónico (6,85 g, 49,7 mmol) y 6-bromo-4-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (13,0 g, 41,4 mmol) en dioxano (200 mL) y agua (50 mL) se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Se agregó PdCl₂(dppf).DCM (3,37 g, 4,14 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó aún más durante 5 minutos y luego se agitó a 125 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se agregó acetato de etilo y la mezcla de reacción

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

se filtró a través de un lecho de celita. Se agregó agua (100 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido transparente color marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente de EtOAc al 0-30% en hexanos para obtener 4-(4-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-6-il)fenol (7,5 g, 22,9 mmol, 55% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₇ClN₂O₂ 329,11 hallado 329,08.

Preparación 38: terc-butilo 3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)(metilo)amino)metilo)azetidina-1-carboxilato

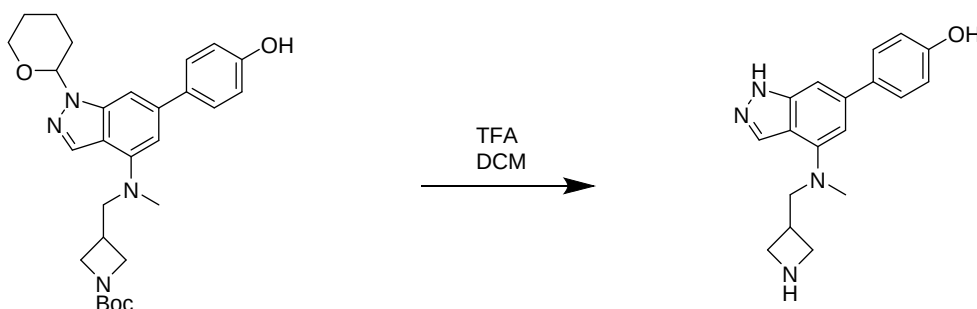


Se agregó una mezcla 1:2 de acetato de paladio (68,3 mg, 0,304 mmol) y 2-(di-t-butilfosfino)bifenil (182,0 mg, 0,608 mmol) a una solución de 4-(4-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-6-il)fenol (500 mg, 1,521 mmol), terc-butilo 3-((metilamino)metilo)azetidina-1-carboxilato (457 mg, 2,281 mmol), y terc-butóxido de sodio, >99,9% (731 mg, 7,60 mmol) en tolueno (15 mL). La mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 × 5 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna combiflash (24 g) con acetato de etilo al 50% en hexanos para obtener terc-butilo 3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

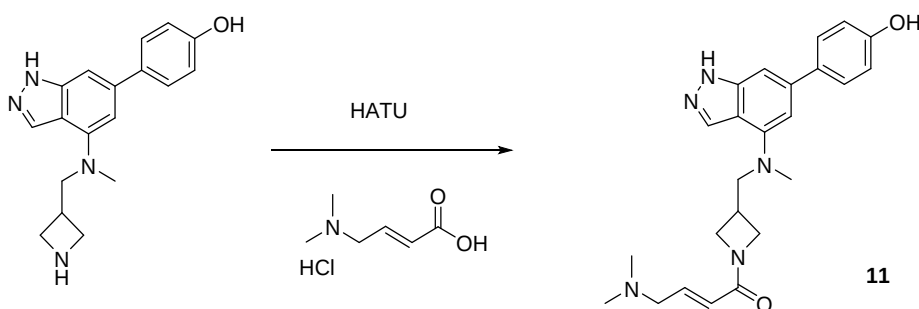
(metilo)amino)metilo)azetidina-1-carboxilato (368 mg, 0,747 mmol, 49% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₈H₃₆N₄O₄ 493,28 hallado 493,4.

Preparación 39: 4-(4-((azetidin-3-ilmetilo)(metilo)amino)-1H-indazol-6-il)fenol



Se disolvió terc-butilo-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il) (metilo)amino)metilo)azetidina-1-carboxilato (368 mg, 0,747 mmol) en diclorometano (1,5 mL) y se agregó lentamente TFA (1,5 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, luego de lo cual, la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La reacción se concentró para proporcionar 4-(4-((azetidin-3-ilmetilo)(metilo)amino)-1H-indazol-6-il)fenol como sal de TFA (100% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₀N₄O 309,17 hallado 309,2.

Ejemplo 11: (E)-4-(dimetilamino)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)(metilo)amino)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-ona

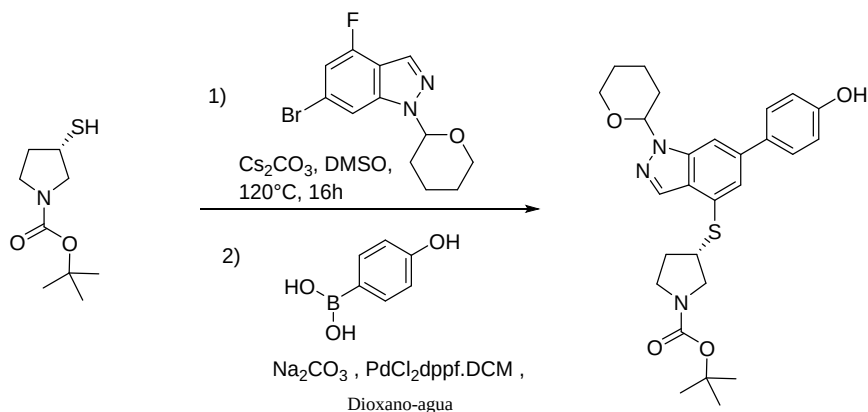


Se agregó HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio hexafluorofosfato, 59,5 mg, 0,157 mmol) a una solución de clorhidrato de ácido

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (34 mg, 0,263 mmol) en DMF (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se agregó 4-(4-((azetidin-3-ilmetilo)(metilo)amino)-1H-indazol-6-il)fenol, sal de TFA (63 mg, 0,149 mmol), seguida por DIPEA (0,260 mL, 1,491 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna Zorbax Bonus-RP (2,1 x 30 mm, 1,8 micrones) a escala preparatoria con acetonitrilo al 5-65% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (E)-4-(dimetilamino)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il) (metilo)amino)metilo)azetidin-1-il)but-2-en-1-ona (47,6 mg, 0,086 mmol, 96% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₄H₂₉N₅O₂ 420,24 hallado 420,2.

Preparación 40: terc-butilo (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidina-1-carboxilato

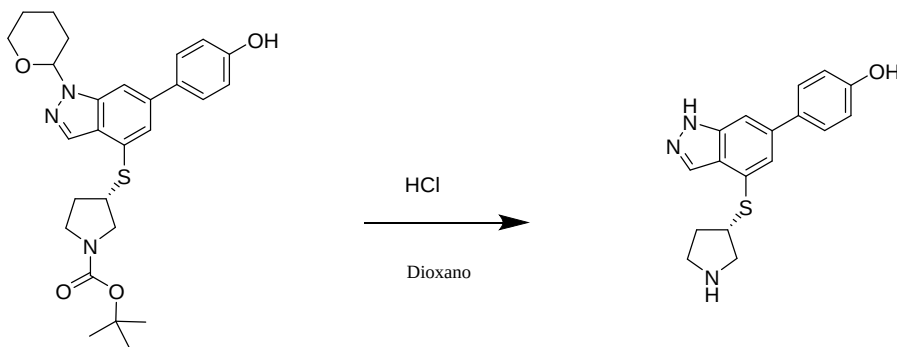


A una solución agitada de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (600 mg, 2,0 mmol) y terc-butilo (S)-3-mercaptopirrolidina-1-carboxilato (488 mg, 2,20 mmol) en DMSO (5 mL), se agregó Cs₂CO₃ (1,30 mg, 4,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 16 horas. Se añadió agua y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). Los extractos de EtOAc se combinaron, se lavaron con agua seguida de salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para obtener el producto intermedio crudo como un líquido viscoso transparente.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

A una solución agitada del producto intermedio crudo en dioxano (20 mL) y agua (4 mL) se le agregó ácido 4-hidroxifenilborónico (240 mg, 1,74 mmol) y Na_2CO_3 (461 mg, 4,35 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Se agregó $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{DCM}$ (118 mg, 0,0145 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó aún más durante 5 minutos y luego se agitó a 110 °C durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se agregó agua y la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (3 × 50 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido transparente color marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con un gradiente de EtOAc al 30-50% en hexanos para obtener terc-butilo (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidina-1-carboxilato (600 mg, 1,21 mmol, 61%). (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ 496,23 hallado 496,42.

Preparación 41: (S)-4-(4-(pirrolidin-3-iltio)-1H-indazol-6-il)fenol

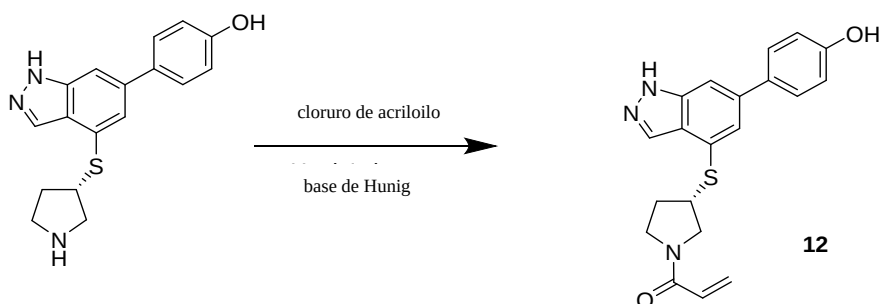


Se agregó HCl 4,0N en dioxano (10,0 mL, 40,0 mmol) a una solución de terc-butilo (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidina-1-carboxilato (400 mg, 0,808 mmol) en metanol (6 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente del 20-80% de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-4-(4-(pirrolidin-3-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

ilitio)-1H-indazol-6-il)fenol como sal de TFA (175 mg, 0,411 mmol, rendimiento del 51%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₁₇N₃OS 312,12 hallado 312,22.

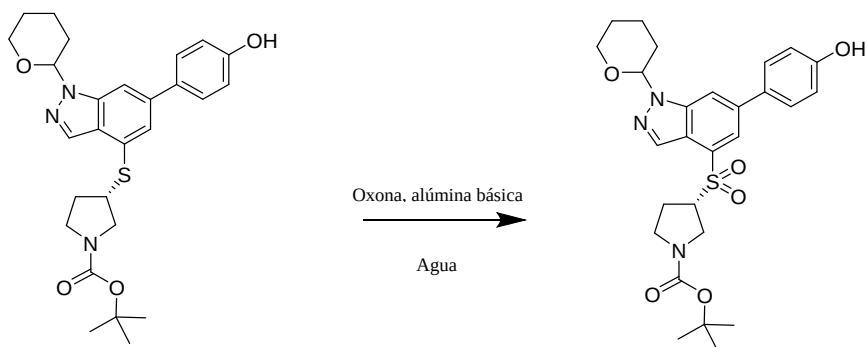
Ejemplo 12: (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,079 mL, 0,450 mmol) a una solución de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ito)-1H-indazol-6-il)fenol, sal de TFA (38,5 mg, 0,091 mmol) en DMF (0,2 mL) a 0 °C, seguida por cloruro de acrilóilo (8,0 µL, 0,099 mmol). La mezclas de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (17,1 mg, 0,046 mmol, 51% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₁₉N₃O₂S 366,13 hallado 366,1.

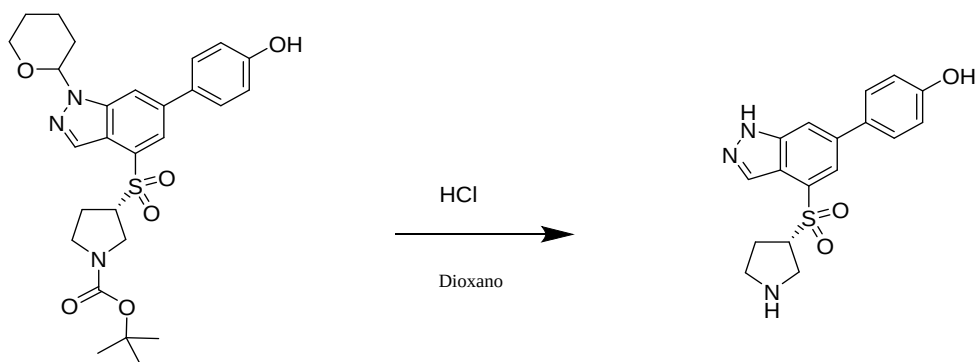
Preparación 42: terc-butilo (3S)-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)sulfonil)pirrolidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregaron alúmina básica (200 mg) y Oxona (744 mg, 2,42 mmol) a una solución de terc-butilo (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)tio)pirrolidina-1-carboxilato (400 mg, 0,80 mmol) en cloroformo (50 mL) y agua (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celita, y el material filtrado se lavó con cloroformo. Los filtrados se combinaron, se agregó agua y la mezcla se extrajo con cloroformo (3 x 100 mL). Los extractos de cloroformo se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con EtOAc al 30% en hexanos para obtener terc-butilo (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)sulfonyl)pirrolidina-1-carboxilato (200 mg, 0,379 mmol, 47%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₃₃ClN₃O₆ 528,22 hallado 528,48.

Preparación 43: (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilsulfonyl)-1H-indazol-6-il)fenol

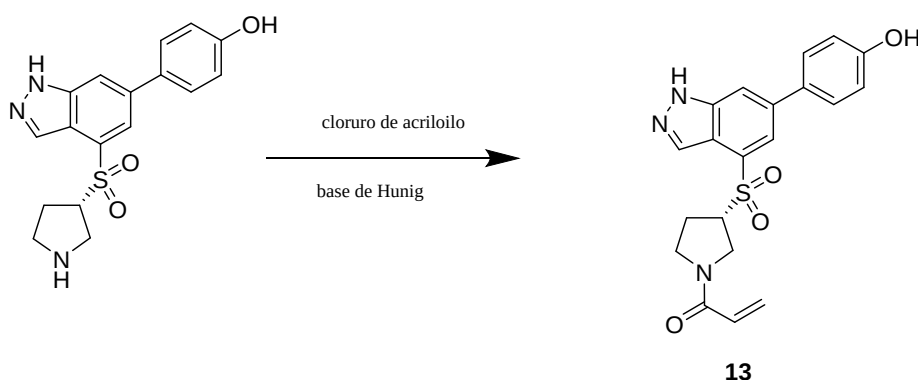


Se agregó HCl 4,0N en dioxano (10,0 mL, 40,0 mmol) a una solución de (3S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)sulfonyl)pirrolidina-1-carboxilato (200 mg, 0,379 mmol) en metanol (2 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. La mezcla

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

de reacción se concentró *al vacío* y el residuo resultante se trituró con éter dietílico para obtener (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilsulfonil)-1H-indazol-6-il)fenol como sal de HCl (140 mg, 0,369 mmol, rendimiento del 97%). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₁₇N₃O₃S 344,11 hallado 344,04.

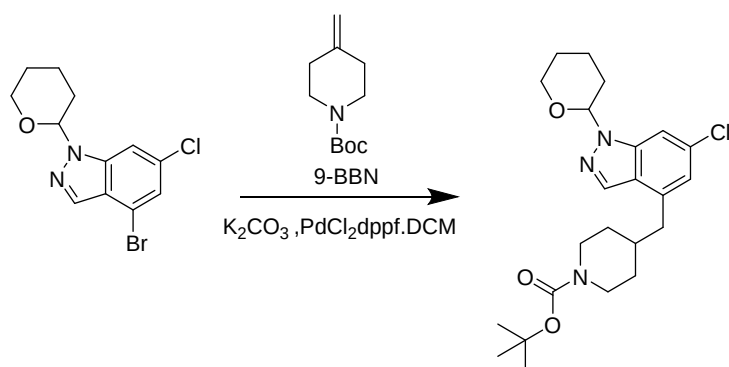
Ejemplo 13: (S)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)sulfonil)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,079 mL, 0,450 mmol) a una solución de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilsulfonil)-1H-indazol-6-il)fenol, sal de HCl (31,0 mg, 0,082 mmol) en DMF (0,2 mL) a 0 °C, seguida por cloruro de acrililo (8,0 µL, 0,099 mmol). La mezclas de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)sulfonil)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (3,1 mg, 0,0061 mmol, 7% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₁₉N₃O₄S 398,12 hallado 398,0.

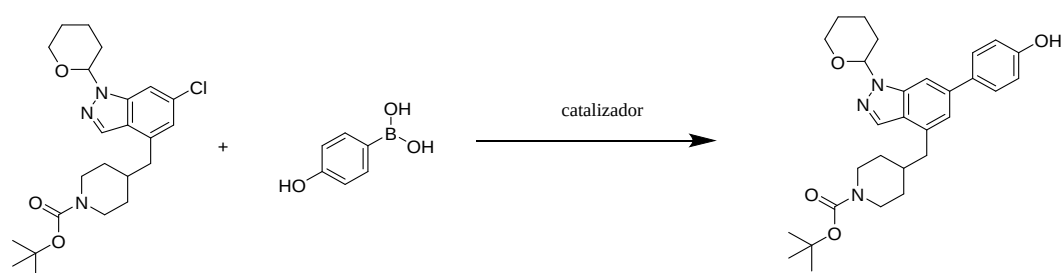
Preparación 44: terc-butilo 4-((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó una solución 0,5 M de 9-BBN en THF (7,92 mL, 3,96 mmol) a terc-butilo 4-metilenopiperidina-1-carboxilato (468 mg, 2,37 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se canuló en una solución preformada de 4-bromo-6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (500 mg, 1,58 mmol), carbonato de potasio (548 mg, 3,96 mmol) y Pd(dppf)Cl₂.DCM (129 mg, 0,15 mmol) en DMF (10,0 mL) y H₂O (2,0 mL). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celita y el material filtrado se lavó con acetato de etilo. Los filtrados se combinaron, se agregó agua (100 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con EtOAc al 30% en hexanos para obtener terc-butilo 4-((6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato (460 mg, 1,06 mmol, 67% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₃₂ClN₃O₃ 434,22 hallado 434,47.

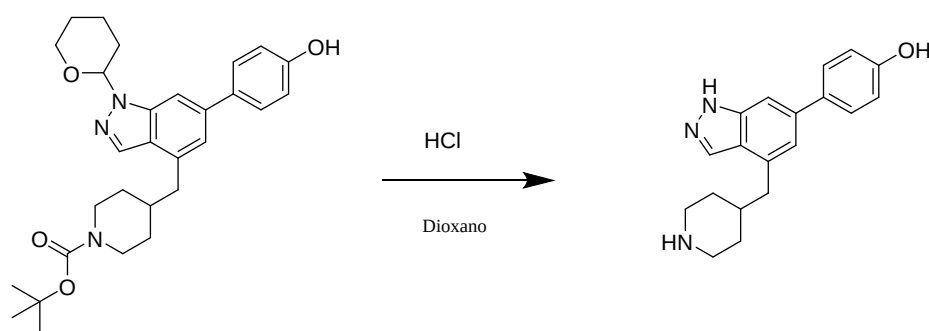
Preparación 45: terc-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato



P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Se agregó ácido 4-hidroxifenilborónico (195 mg, 1,41 mmol) a una suspensión de *tert*-butilo 4-((6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato (410 mg, 0,94 mmol) en dioxano (10,0 mL) y agua (2,0 mL), seguido de fosfato de potasio (401 mg, 1,88 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 15 minutos. Se agregó cloruro de 2'-(dimetilamino)-2-bifenilil-paladio(II), complejo de dinorbornilfosfina (52 mg, 0,07 mmol) y la mezcla de reacción se calentó bajo radiación de microondas a 100 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y luego se filtró a través de un lecho de celita. Se agregó agua (100 mL) al filtrado, que se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con EtOAc al 50% en hexanos para obtener *tert*-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato (300 mg, 0,610 mmol, 65%). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₇N₃O₄ 492,29 hallado 492,46.

Preparación 46: 4-(4-(piperidin-4-ilmetilo)-1H-indazol-6-il)fenol

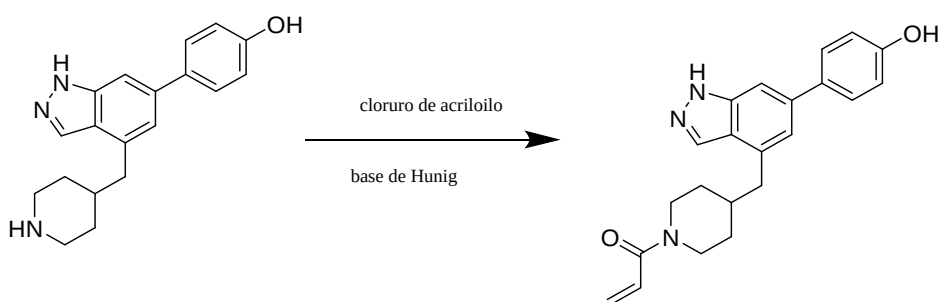


Se agregó HCl 4,0N en dioxano (10,0 mL, 40,0 mmol) a una solución de *tert*-butilo 4-((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidina-1-carboxilato (300 mg, 0,610 mmol) en metanol (2 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se trituroó con éter dietílico para obtener (S)4-(4-(piperidin-4-ilmetilo)-1H-indazol-6-il)fenol como sal

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

de HCl (195 mg, 0,567 mmol, 93% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{19}H_{21}N_3O$ 308,18 hallado 308,10.

Ejemplo 14: 1-(4-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona



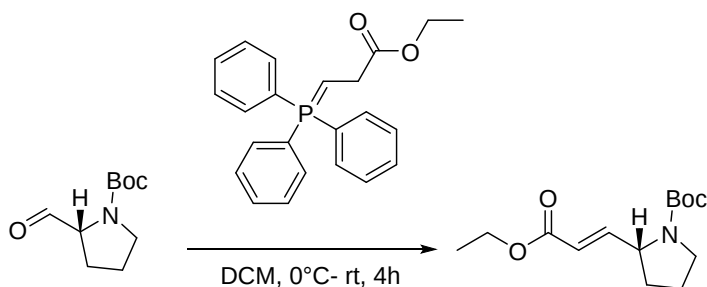
14

Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,079 mL, 0,450 mmol) a una solución de 4-(4-(piperidin-4-ilmetilo)-1H-indazol-6-il)fenol, sal de HCl (27,5 mg, 0,080 mmol) en DMF (0,2 mL) a 0 °C, seguida por cloruro de acrililoilo (8,0 μ L, 0,099 mmol). La mezclas de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener 1-(4-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)metilo)piperidin-1-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

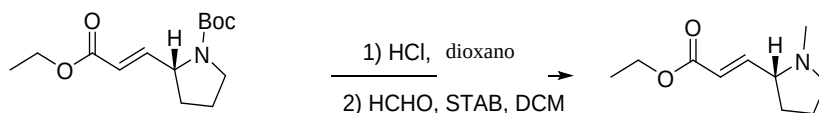
il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (7,2 mg, 0,015 mmol, 19% de rendimiento).
 (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₂₃N₃O₂ 362,19 hallado 362,1.

Preparación 47: terc-butilo (R,E)-2-(3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)pirrolidina-1-carboxilato



Se agregó etilo 3-(trifenilfosforanilidena)propanoato (3,64 g, 10,0 mmol) a una solución de terc-butilo (R)-2-formilpirrolidina-1-carboxilato (2,0 g, 10,0 mmol) en cloruro de metileno (40 mL) a 0 C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se agregó agua (200 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno (2 x 100 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 5% en hexanos para obtener terc-butilo (R,E)-2-(3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)pirrolidina-1-carboxilato (1,70 g, 6,31 mmol, 63% de rendimiento).

Preparación 48: etilo (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrilato

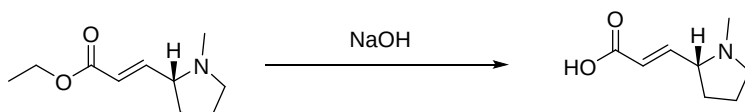


Se añadió HCl 4M en dioxano (7,20 mL, 28,8 mmol) a una solución de TFA (10,90 mL) se añadió lentamente a una solución de terc-butilo (R,E)-2-(3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)pirrolidina-1-carboxilato (1,70 g, 6,31 mmol) en dioxano (40 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

durante 2 horas. La reacción se concentró al vacío para producir el producto intermedio crudo. Se añadió una solución de formaldehído al 37% en agua (4,19 mL, 41,4 mmol) a una solución del producto intermedio crudo en cloruro de metileno (50 mL) a 0 °C, seguido de triacetoxiborohidruro de sodio (5,26 g, 24,8 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se agregó agua helada (20 mL) y la mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno (2 x 100 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir etilo (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrilato 0,900 g, 4,915 mmol, 78% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₀H₁₇NO₂ 184,14 hallado 184,0.

Preparación 49: ácido (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrílico

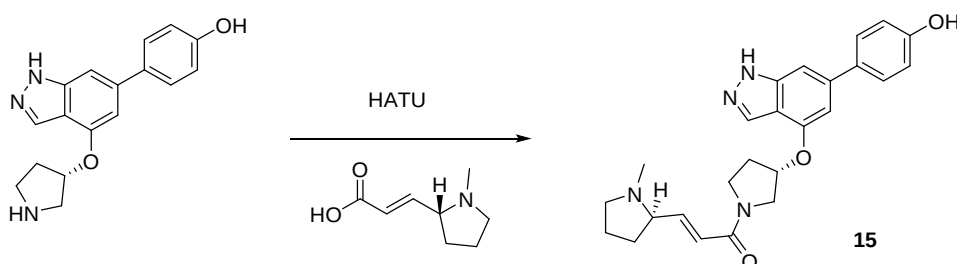


Se agregó hidróxido de sodio (294 mg, 7,36 mmol) a una solución de etilo (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrilato (0,900 g, 4,915 mmol, 78% de rendimiento) en 2:1 THF/agua (15 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío para

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

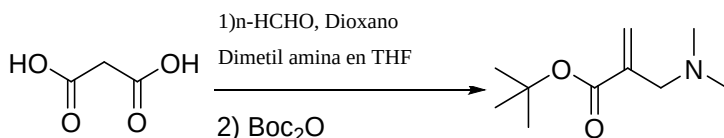
obtener ácido (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrílico (668 mg, 4,30 mmol, 88% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_8H_{13}NO_2$ 156,10 hallado 156,26.

Ejemplo 15: (E)-1-((S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)-3-((R)-1-metilpirrolidin-2-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó HATU (0,031 g, 0,083 mmol) en DMF (0,1 mL) a ácido (R,E)-3-(1-metilpirrolidin-2-il)acrílico (14,0 mg, 0,090 mmol), seguido por una solución de clorhidrato de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol (0,025 g, 0,075 mmol) y DIPEA (0,065 mL, 0,375 mmol), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener ((E)-1-((S)-3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)-3-((R)-1-metilpirrolidin-2-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (7,8 mg, 0,014 mmol, 19% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{25}H_{28}N_4O_3$ 433,23 hallado 433,1.

Preparación 50: terc-butilo 2-((dimetilamino)metilo)acrilato

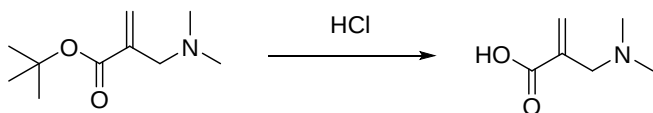


Se agregó paraformaldehído (1,20 g, 43,2 mmol) a una solución de ácido malónico (2,0 g, 19,3 mmol) en 1,4-dioxano (20 mL), seguido de una solución 2M

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

de dimetilamina en THF (9,60 mL, 19,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el producto crudo se recristalizó con éter dietílico y acetona para producir el producto intermedio como un sólido blanco. El sólido blanco intermedio se disolvió en t-BuOH (100 mL) y se agregó dicarbonato de di-terc-butilo (4,60 mL, 20,7 mmol) a la mezcla de reacción seguido de 4-dimetilaminopiridina (511 mg, 4,18 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se agregó cloruro de metileno (500 mL) y la mezcla de reacción se lavó con agua (2 x 500 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con metanol al 2% en cloruro de metileno para producir terc-butilo 2-((dimetilamino)metilo)acrilato (220 mg, 1,19 mmol, rendimiento del 6%).

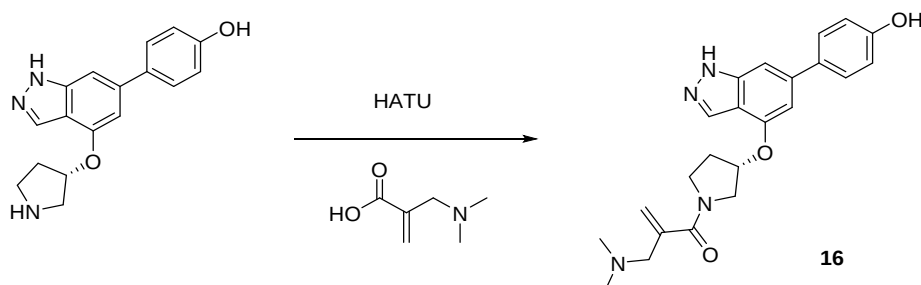
Preparación 51: ácido 2-((dimetilamino)metilo)acrílico



Se agregó una solución acuosa 1N de HCl (5,0 mL, 5 mmol) a terc-butilo 2-((dimetilamino)metilo)acrilato (220 mg, 1,19 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se hizo azeótropo con tolueno y se trituro aún más con éter dietílico para producir ácido 2-((dimetilamino)metilo)acrílico como una sal de HCl (119 mg, 0,719 mmol, 60% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₆H₁₁NO₂ 130,09 hallado 130,22.

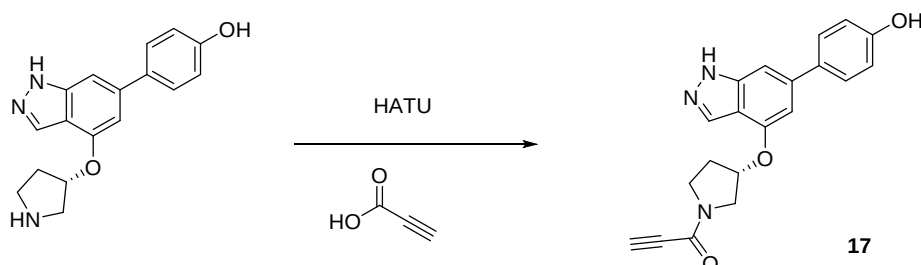
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ejemplo 16: (S)-2-((dimetilamino)metilo)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó HATU (0,031 g, 0,083 mmol) en DMF (0,1 mL) a ácido 2-((dimetilamino)metilo)acrílico clorhidrato (14,9 mg, 0,090 mmol), seguido por una solución de clorhidrato de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol (0,025 g, 0,075 mmol) y DIPEA (0,065 mL, 0,375 mmol), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-2-((dimetilamino)metilo)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (2,6 mg, 0,005 mmol, 7% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₆N₄O₃ 407,21 hallado 407,1.

Ejemplo 17: (S)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-in-1-ona

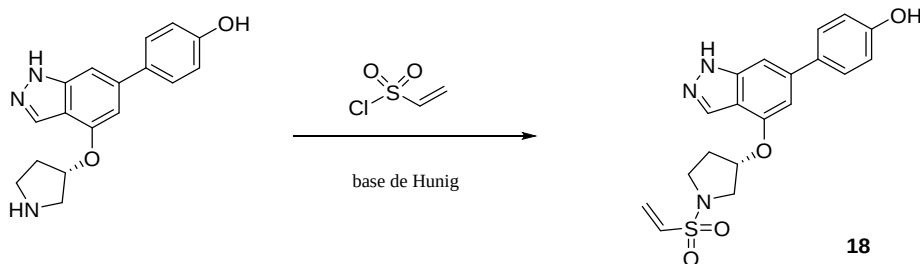


Se agregó HATU (0,031 g, 0,083 mmol) en DMF (0,1 mL) a ácido propiólico (6,0 mg, 0,090 mmol), seguido por una solución de clorhidrato de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol (0,025 g, 0,075 mmol) y DIPEA

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(0,065 mL, 0,375 mmol), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-((6-(4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidin-1-il)prop-2-in-1-ona como sal de TFA (2,4 mg, 0,005 mmol, 7% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₁₇N₃O₃ 348,14 hallado 348,0.

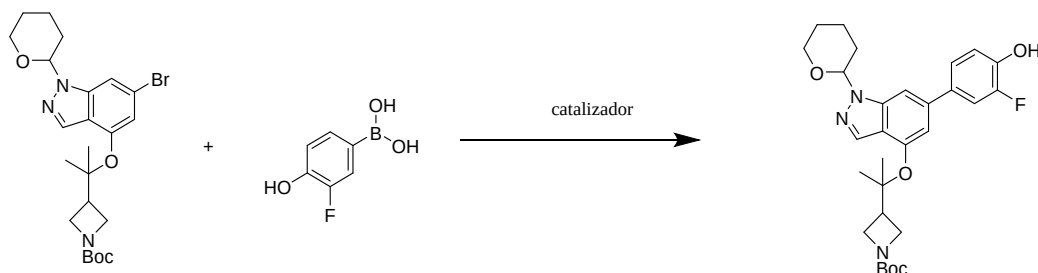
Ejemplo 18: (S)-4-(4-((1-(vinilsulfonil)pirrolidin-3-il)oxi)-1H-indazol-6-il)fenol



Se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,052 mL, 0,301 mmol) a una solución de clorhidrato de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-iloxil)-1H-indazol-6-il)fenol (0,020 g, 0,060 mmol) en DMF (0,2 mL) a 0 °C, seguida de cloruro de etenosulfonil (8,4 mL, 0,066 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y el líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-4-(4-((1-(vinilsulfonil)pirrolidin-3-il)oxi)-1H-indazol-6-il)fenol como sal de TFA (8,2 mg, 0,016 mmol, 27% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₁₉N₃O₄ 386,12 hallado 386,3.

Preparación 52: terc-butilo 3-(2-((6-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

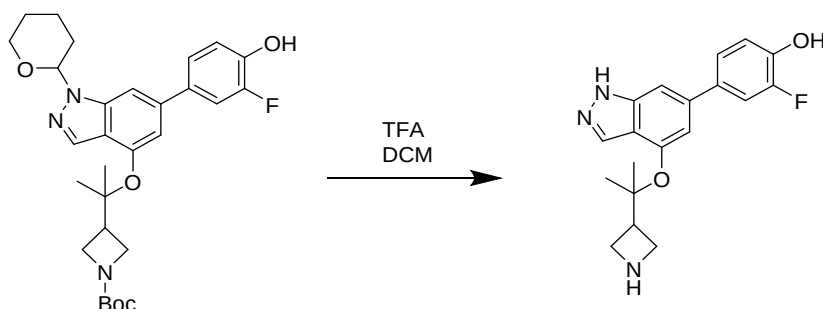


Se agregó carbonato de cesio (6,33 g, 19,42 mmol) a una solución de terc-butilo 3-(2-((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (3,20 g, 6,47 mmol) y ácido 3-fluoro-4-hidroxibencenoborónico (1,514 g, 9,71 mmol) en 1,4-dioxano (20,71 mL) y agua (5,18 mL) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos.

Se añadió dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) (0,793 g, 0,971 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa de cloruro de amonio (20 mL) y la mezcla se extrajo con cloruro de metileno (2 × 20 mL). Los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 50% en hexanos para obtener 3-(2-((6-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (2,30 g, 4,38 mmol, 68% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₇FN₃O₅ 526,27 hallado 526,3.

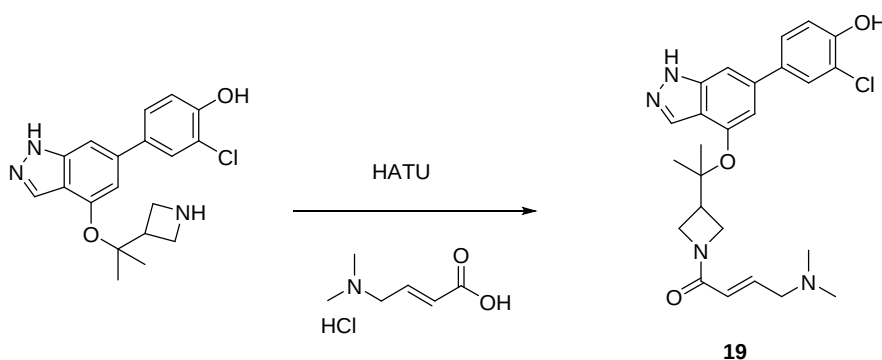
Preparación 53: 4-(4-((2-azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-fluorofenol

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se disolvió terc-butilo 3-(2-((6-fluoro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (3,10 g, 5,90 mmol) en diclorometano (10 mL) y se agregó lentamente TFA (10 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La reacción se concentró para proporcionar 4-(4-((2-azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-fluorofenol como sal de TFA (100% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{19}H_{21}FN_3O_2$ 342.16 hallado 342,3.

Ejemplo 19: (E)-1-(3-(2-((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)-4-(dimetilamino)but-2-en-1-ona

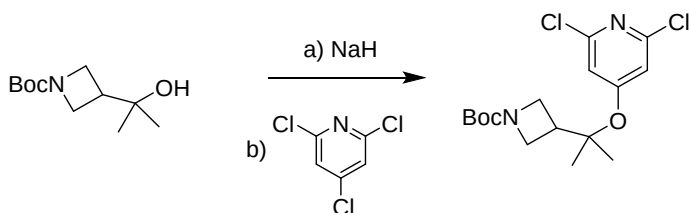


Se agregó HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio hexafluorofosfato, 2,92 g, 7,07 mmol) a una solución de clorhidrato de ácido (E)-4-(dimetilamino)but-2-enoico (1,07 g, 6,48 mmol) en DMF (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se agregó

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

4-(4-((2-azetidín-3-il)propan-2-il)oxi)-1-H-indazol-6-il)-2-fluorofenol, sal de TFA (2,01 g, 5,89 mmol), seguida por DIPEA (3,08 mL, 17,7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se concentró al vacío para producir un líquido color amarillo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 20-80% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (E)-4-(dimetilamino)-1-(3-(2-((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-indazol-4-il)oxi)propan-2-il)ciclobutil)but-2-en-1-ona como sal de TFA (1,65 g, 3,65 mmol, 61,9% de rendimiento). (*m/z*): $[M+H]^+$ calculado para $C_{25}H_{30}FN_4O_3$ 453.23 hallado 453,3.

Preparación 54: terc-butilo 3-(2-((2,6-dicloropiridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato

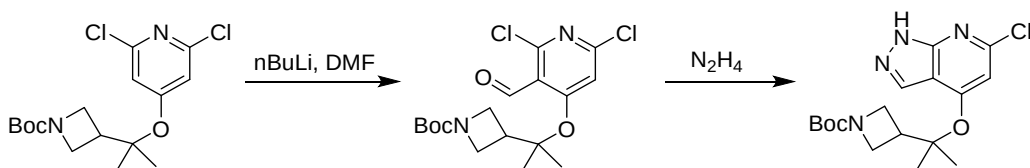


Se agregó gota a gota una solución de terc-butilo 3-(2-hidroxipropan-2-il)azetidina-1-carboxilato (6,5 g, 30,21 mmol) en DMSO (10 mL) a una solución de hidruro de sodio al 60% en peso en aceite mineral (1,65 g, 41,20 mmol) en DMSO (15 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregó gota a gota a la suspensión resultante una solución de 2,4,6-tricloropiridina (5,0 g, 27,62 mmol) en DMSO (25 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se desactivó con una solución acuosa saturada de cloruro de amonio y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el líquido crudo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 5% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(2-((2,6-dicloropiridin-4-il)oxi)propan-2-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

il)azetidina-1-carboxilato (2,10 g, 5,80 mmol, 21,1% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₂₃Cl₂N₂O₃ 361,11 hallado 361,11.

Preparación 55: terc-butilo 3-(2-((6-cloro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato



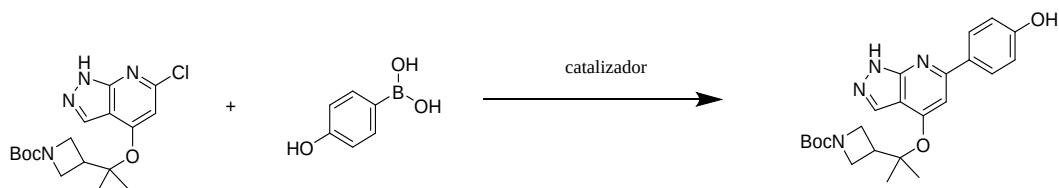
Se agregó gota a gota una solución 2M de nBuLi en hexanos (3,05 mL, 6,11 mmol) a una solución de terc-butilo 3-(2-((2,6-dicloropiridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (2,0 g, 5,55 mmol) en THF (40 mL) a -78 °C. Se agregó DMF (0,64 mL, 8,33 mmol) en una parte y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 10 minutos. Se agregó ácido acético al 5% en éter dietílico y la mezcla se diluyó aún más con agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 veces). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el producto intermedio crudo terc-butilo 3-(2-((2,6-dicloro-3-formilpiridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato.

Se agregó gota a gota hidrato de hidracina (1,0 mL, 20,56 mmol) a una solución del producto crudo terc-butilo 3-(2-((2,6-dicloro-3-formilpiridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato en THF (40 mL) a 0 °C, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se agregó trietilamina (1,45 mL, 10,28 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el líquido crudo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 20% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(2-((6-cloro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(1,20 g, 3,27 mmol, 58,9% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado para $C_{17}H_{23}ClN_4O_3$ 367,15 hallado 367,00.

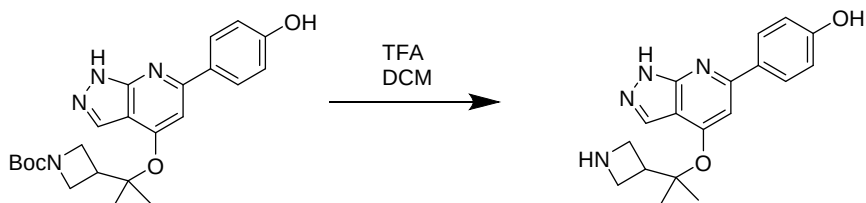
Preparación 56: terc-butilo 3-(2-((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato



Se añadió carbonato de sodio (636 mg, 6,00 mmol) a una solución de terc-butilo 3-(2-((6-cloro-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (1,1 g, 3,00 mmol) en dioxano/agua 4: 1 (15 mL), seguido de ácido fenolborónico (496 mg, 3,60 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con argón durante 10 minutos. Se agregó aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (245 mg, 0,3 mmol), la mezcla de reacción se desgasificó aún más con argón durante 5 minutos y la mezcla de reacción se agitó bajo radiación de microondas a 130 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el líquido crudo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 50% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(2-((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (650 mg, 1,53 mmol, 51,0% de rendimiento). (m/z): $[M+H]^+$ calculado $C_{23}H_{29}N_4O_4$ 425,22 hallado 425,21.

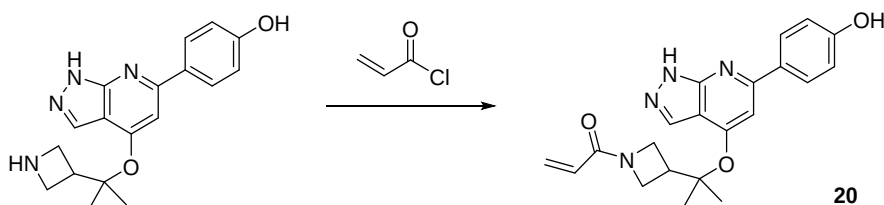
Preparación 57: 4-(4-((2-(azetidín-3-il)propan-2-il)oxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se disolvió terc-butilo 3-(2-((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidina-1-carboxilato (630 mg, 1,48 mmol) en diclorometano (10 mL) y se agregó lentamente TFA (6,3 mL). La solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, después de lo cual la LCMS indicó una buena conversión al producto deseado. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se trituró con acetonitrilo y éter dietílico para obtener 4-(4-((2-(azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol como sal de TFA (100% de rendimiento). (*m/z*): [*M*+*H*]⁺ calculado para C₁₈H₂₁N₄O₂ 325,17 hallado 325,13.

Ejemplo 20: 1-(3-(2-((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-1-il)prop-2-en-1-ona

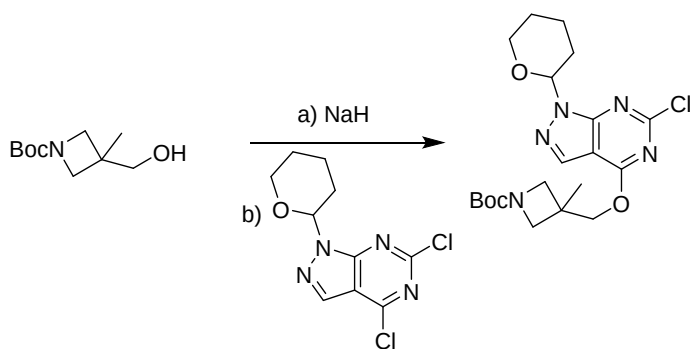


Se agregó diisopropiletilamina (0,298 mL, 1,711 mmol) a una solución de 4-(4-((2-(azetidin-3-il)propan-2-il)oxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol, sal de TFA (150 mg, 0,342 mmol) en DMF (3,00 mL) a 0 °C, seguido de cloruro de acrililo (0,031 mL, 0,376 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un líquido color marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 10-70% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener 1-(3-(2-((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)propan-2-il)azetidin-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (80,5 mg, 0,163 mmol, 47,8% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₃N₄O₃ 379,18 hallado 379,3.

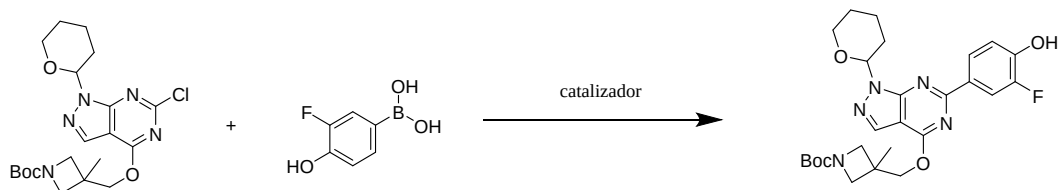
Preparación 58: terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato



Se agregó hidruro de sodio (211 mg, 8,79 mmol) a una solución de terc-butilo 3-(hidroximetilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato (973 mg, 4,83 mmol) en DMF (4,4 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, la mezcla de reacción se agregó gota a gota a una solución de 4,6-dicloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d] pirimidina (1,20 g, 4,39 mmol) en DMF (4,4 mL) 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se desactivó agregando agua (1 mL) y la mezcla resultante se concentró al vacío para producir un líquido marrón claro. Se agregó agua (10 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (5 mL) y se secaron sobre sulfato de sodio para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 40% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato (1,06 g, 4,39 mmol, 54,9% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₉ClN₅O₄ 438,19 hallado 438,6.

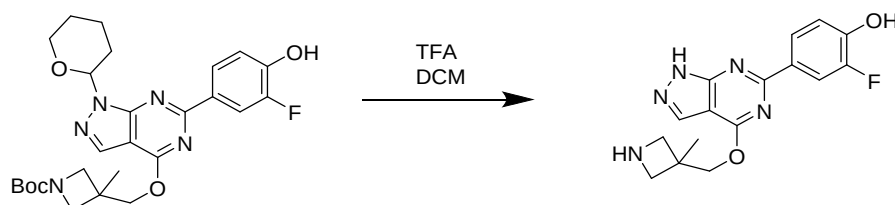
Preparación 59: terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó fosfato de potasio tribásico (218 mg, 1,03 mmol) a una solución de terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato (150 mg, 0,343 mmol) en 4:1 dioxano/agua (1,71 mL), seguido de ácido 3-fluoro-4-hidroxifenilborónico (80,0 mg, 0,514 mmol) y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregaron acetato de paladio (15,4 mg, 0,069 mmol) y 1,1'-bis(di-t-butilfosfino)ferroceno (32,5 mg, 0,069 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 mL. Se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (20 mL) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 × 20 mL). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 40% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-carboxilato (65 mg, 0,343 mmol, 37,0% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₆H₃₃FN₅O₅ 514,25 hallado 514,7.

Preparación 60: 2-fluoro-4-(4-((3-metilazetidina-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)fenol

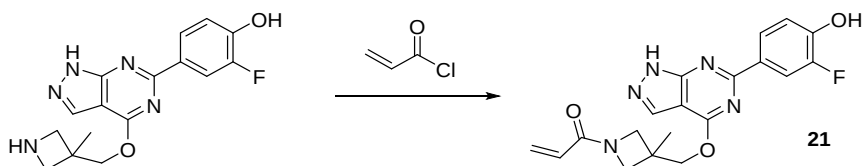


Se disolvió terc-butilo 3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidina-1-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

carboxilato (65 mg, 0,127 mmol) en diclorometano (0,56 mL), se agregó TFA (0,56 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La reacción se concentró al vacío para obtener 2-fluoro-4-(4-((3-metilazetidín-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)fenol como sal de TFA (100% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₁₇FN₅O₂ 330,14 hallado 330,3.

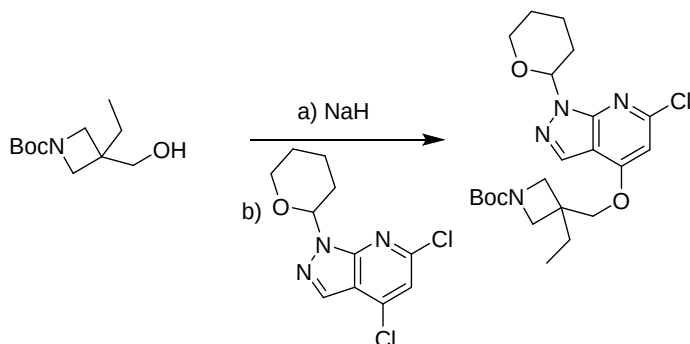
Ejemplo 21: 1-(3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidín-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó diisopropiletilamina (0,210 mL, 1,20 mmol) a una solución de 2-fluoro-4-(4-((3-metilazetidín-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-il)fenol, sal de TFA (53,2 mg, 0,12 mmol) en DMF (0,60 mL) a 0 °C, seguido de cloruro de acrililo (9,75 µL, 0,120 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un líquido crudo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 10-60% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener 1-(3-(((6-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)oxi)metilo)-3-metilazetidín-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (10,5 mg, 0,120 mmol, 21,7% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₉H₁₉FN₅O₃ 384,15 hallado 384,3.

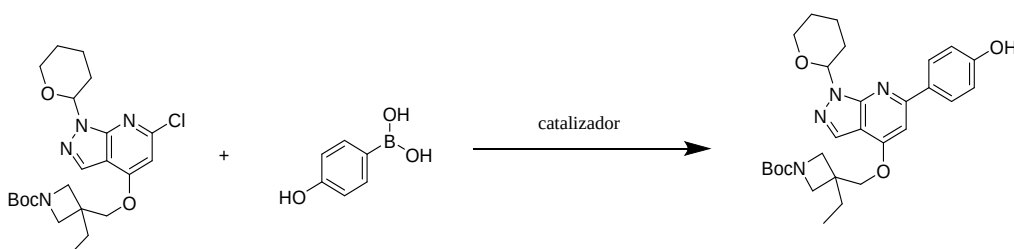
Preparación 61: terc-butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)-3-etilazetidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó hidruro de sodio al 60% en peso en aceite mineral (353 mg, 8,82 mmol) a una solución de terc-butilo 3-etilo-3-(hidroximetilo)azetidina-1-carboxilato (1,1 g, 4,85 mmol) en DMF (10 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Una solución de 4,6-dicloro-1-((tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-d]piridina (1,20 g, 4,41 mmol) en DMF (5 mL) se agregó a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se desactivó agregando agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y luego se secaron sobre sulfato de sodio para producir un residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 5% en hexanos para obtener terc-butilo 3-(((6-cloro-1-((tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)-3-etilazetidina-1-carboxilato (900 mg, 4,39 mmol, 45,2% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₃₂ClN₄O₄ 451,21 hallado 451,13.

Preparación 62: terc-butilo 3-etilo-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato



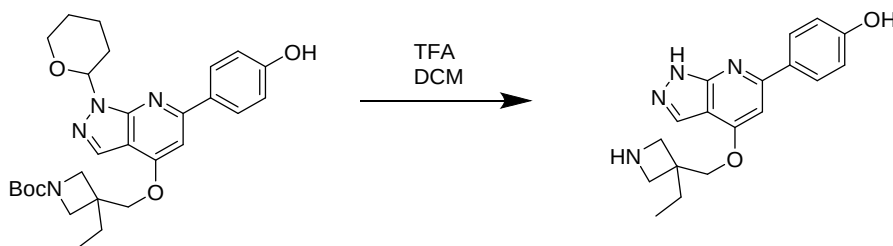
Se agregó una solución de ácido fenolborónico (413 mg, 2,99 mmol) y carbonato de sodio (421 mg, 3,98 mmol) en agua (2 mL) a la solución de terc-

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

butilo 3-(((6-cloro-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)-3-etilazetidina-1-carboxilato (900 mg, 1.99 mmol) en dioxano (8 mL) y la reacción se desgasificó con argón durante 5 minutos.

Se agregó aducto de dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]paladio(II) diclorometano (162 mg, 0,19 mmol), la mezcla de reacción se desgasificó aún más con argón durante 5 minutos y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se filtró a través de Celita. Se añadió agua, la capa de acetato de etilo se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el líquido crudo. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 30% en hexanos para obtener terc-butilo 3-etil-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (800 mg, 1,57 mmol, 79,0% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado C₂₈H₃₇N₄O₅ 509,28 hallado 509,29.

Preparación 63: 4-(4-((3-etilazetidín-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol

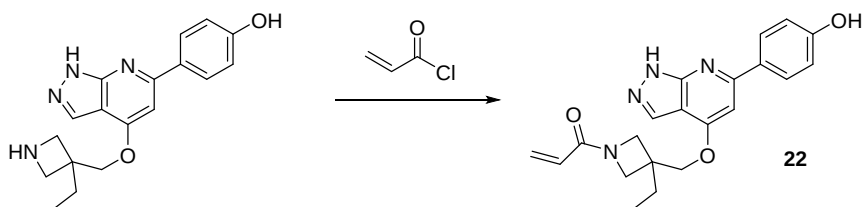


Se disolvió terc-butilo 3-etilo-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidina-1-carboxilato (800 mg, 1,57 mmol) en diclorometano (10 mL), se agregó TFA (10 mL) 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se trituroó con éter dietílico.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

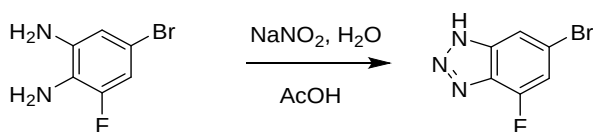
El residuo crudo se disolvió en un mínimo de acetonitrilo y se precipitó con éter dietílico para obtener 4-(4-((3-etilazetidin-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol como sal de TFA (287 mg, 0,885 mmol, 56,3% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₁N₄O₂ 325,17 hallado 325,07.

Ejemplo 22: 1-(3-etilo-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó diisopropiletilamina (0,246 mL, 1,41 mmol) a una solución de 4-(4-((3-etilazetidin-3-il)metoxi)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-6-il)fenol, sal de TFA (124 mg, 0,283 mmol) en DMF (2,0 mL) a 0 °C, seguido de cloruro de acilo (25 µl, 0,311 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 20-80% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener 1-(3-etilo-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-il)oxi)metilo)azetidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (44,8 mg, 0,118 mmol, 41,9% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₃N₄O₃ 379,18 hallado 379,3.

Preparación 64: 6-bromo-4-fluoro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol

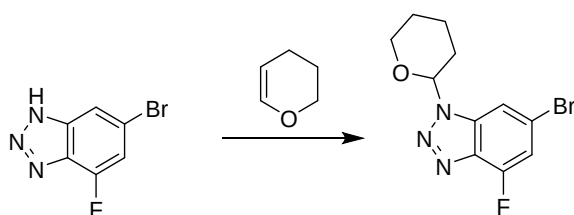


Se agregó una solución de nitrito de sodio (1,85 g, 26,8 mmol) en agua (50 mL) a una solución de 5-bromo-3-fluorobenceno-1,2-diamina (5,00 g,

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

24,4 mmol) en agua (50 mL) y ácido acético (18,0 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego a 85 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se agregó agua al residuo resultante. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 300 mL), los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir 6-bromo-4-fluoro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (5,0 g, 23,1 mmol, 94,0% de rendimiento). (m/z): [M-H]⁻ calculado para C₆H₃BrFN₃ 213,94 hallado 213,94.

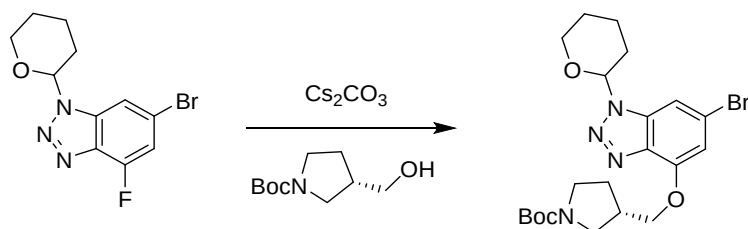
Preparación 65: 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol



Se agregó ácido p-toluenosulfónico (796 mg, 4,62 mmol) a una solución de 6-bromo-4-fluoro-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (5,0 g, 23,1 mmol) en tetrahydrofurano (200 mL), seguida de 3,4-dihidro-2H-pirano (7,7 g, 92,6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 10% en hexanos para obtener 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (3,8 g, 12,7 mmol, 55,4% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₁₁H₁₂BrFN₃O 300,01 hallado 300,09.

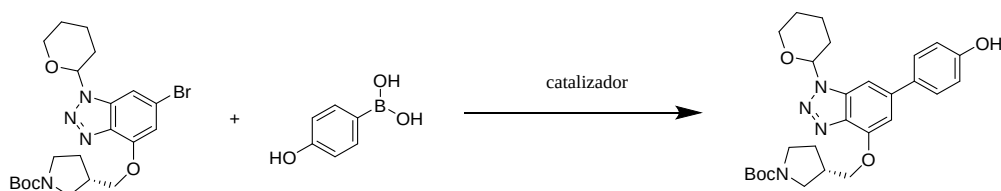
Preparación 66: terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó carbonato de cesio (1,50 g, 4,64 mmol) a una solución de terc-butilo (S)-3-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato (564 mg, 2,80 mmol) en DMSO (15 mL) a 0 °C, seguida de 6-bromo-4-fluoro-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (700 mg, 2,34 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 3 horas. Se agregó agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 veces). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua y una solución acuosa de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 30% en hexanos para obtener terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato (500 mg, 1,04 mmol, 45,6% de rendimiento). (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₃₀BrN₄O₄ 481,15 hallado 481,2.

Preparación 67: terc-butilo (3S)-3-(((6-(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato

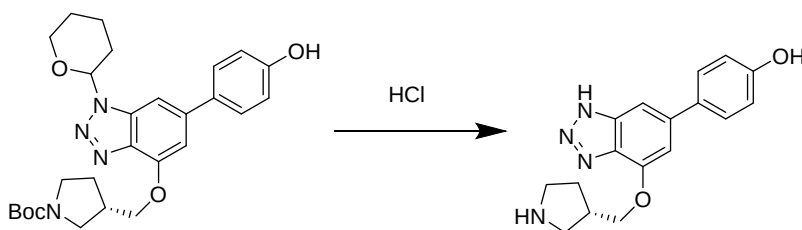


Se agregó ácido fenilborónico (192 mg, 1,40 mmol) a una solución de terc-butilo (3S)-3-(((6-bromo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato (450 mg, 0,93 mmol) en dioxano (10 mL) y agua (2 mL), seguido de fosfato de potasio (394 mg, 1,86 mmol) y la reacción se desgasificó con argón durante 15 minutos. Se agregó cloruro de 2'-(dimetilamino)-2-bifenilil-paladio(II), complejo de dinorbornilfosfina (52 mg,

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

0,093 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 40 minutos bajo radiación de microondas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celita. Se agregó agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 veces). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío para producir el residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna flash con acetato de etilo al 30% en hexanos para obtener *terc*-butilo (3*S*)-3-(((6(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (300 mg, 0,607 mmol, 65,0% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₃₅N₄O₅ 495,26 hallado 495,06.

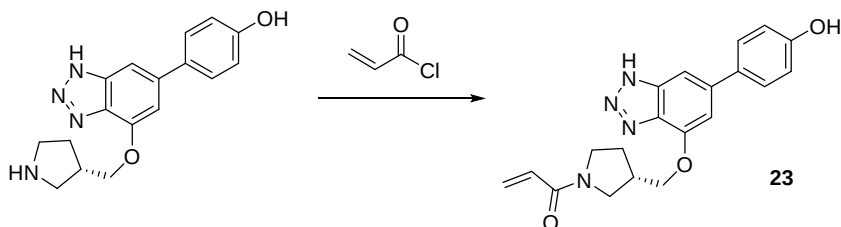
Preparación 68: (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-il)fenol



Se agregó ácido clorhídrico 4M en dioxano (10,0 mL, 40 mmol) a una solución de *terc*-butilo ((3*S*)-3-(((6(4-hidroxifenil)-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidina-1-carboxilato (230 mg, 0,465 mmol) en metanol (2 mL), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se trituroó con éter dietílico para obtener (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-il)fenol como sal de clorhidrato (225 mg, 0,649 mmol, 85,0% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₁₉N₄O₂ 311,15 hallado 311,06.

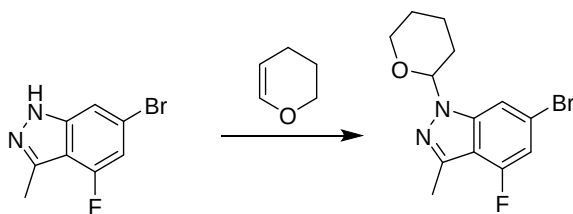
Ejemplo 23: (S)-1-(3-(((6(4-hidroxifenil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020



Se agregó diisopropiletilamina (0,083 mL, 0,475 mmol) a una solución de (S)-4-(4-(pirrolidin-3-ilmetoxi)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-6-il)fenol, sal de clorhidrato (32,9 mg, 0,095 mmol) en DMF (0,475 mL) a 0 °C, seguido de cloruro de acrililo (7,7 µL, 0,095 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un líquido marrón. El líquido crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 5-75% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-(((6-(4-hidroxifenil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (2,5 mg, 0,068 mmol, 7,2% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₁N₄O₃ 365,16 hallado 365,1.

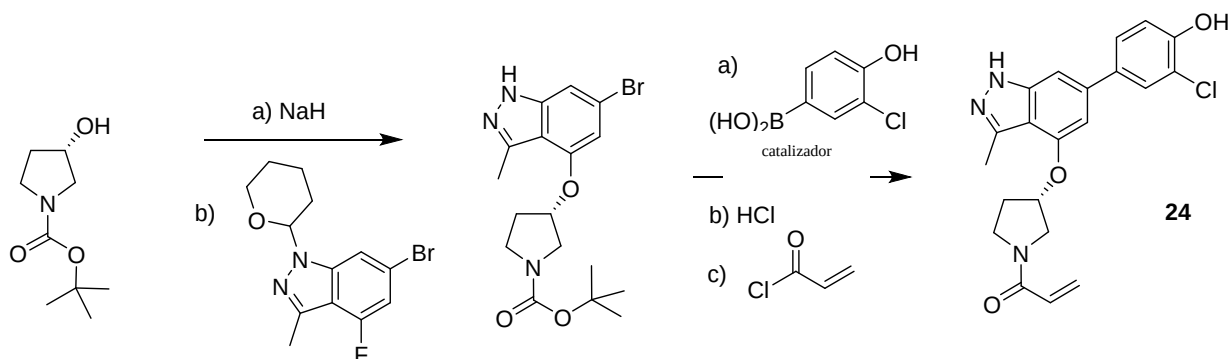
Preparación 69: 6-bromo-4-fluoro-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol



Se agregó ácido p-toluenosulfónico (236 mg, 1,24 mmol) a una solución de 6-bromo-4-fluoro-3-metilo-1H-indazol (2,84 g, 12,4 mmol) en diclorometano (41 mL), seguida de 3,4-dihidro-2H-pirano (3,13 g, 37,2 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice y el filtrado se concentró al vacío para obtener 6-bromo-4-fluoro-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (3,3 g, 10,5 mmol, 85% de rendimiento). (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₁₃H₁₄BrFN₂NaO 335,02 hallado 335,4.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ejemplo 24: (S)-1-(3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-3-metilo-1H-indazol-4-il)oxy)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona



Se agregó 60% en peso de hidruro de sodio en aceite mineral (319 mg, 7,98 mmol) a una solución de (S)-1-boc-3-hidroxipirrolidina (1,3 g, 6,94 mmol) en DMF (16 mL) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se agregó 6-bromo-4-fluoro-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol (1,00 g, 3,19 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se interrumpió con la adición de agua y la mezcla se concentró al vacío para producir el intermedio crudo de terc-butilo (3S)-3-((6-bromo-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato.

Se agregaron ácido 3-cloro-4-hidroxifenilborónico (0,484 g, 2,81 mmol) y fosfato de potasio tribásico (1,19 g, 5,62 mmol) a una solución del crudo terc-butilo (3S)-3-((6-bromo-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato en dioxano/agua 2:1 (9,5 mL), y la mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno durante 10 minutos. Se agregó (2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropil-1,1'-bifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) metanosulfonato, XPhos-G3-Paladaciclo (95 mg, 0,112 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 3 horas bajo radiación de microondas. Se agregó agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron y se concentraron al vacío para obtener el producto intermedio crudo de terc-butilo (3S)-3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-3-metilo-1-(tetrahydro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

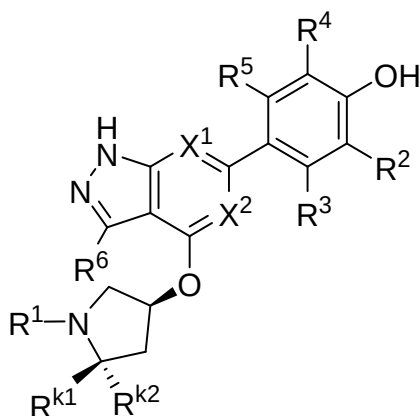
Se agregó HCl 4,0N en dioxano (3,75 mL, 15,0 mmol) a una solución del producto crudo terc-butilo (3S)-3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-3-metilo-1-(tetrahidro-2H-pirano-2-il)-1H-indazol-4-il)oxi)pirrolidina-1-carboxilato en metanol (0,5 mL), y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener el producto intermedio crudo (S)-2-cloro-4-(3-metilo-4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol.

Se agregó N,N-diisopropiletilamina (4,59 mL, 26,3 mmol) a una solución del producto intermedio crudo (S)-2-cloro-4-(3-metilo-4-(pirrolidin-3-iloxi)-1H-indazol-6-il)fenol en cloruro de metileno (3,75 mL), seguida de cloruro de acrilóilo (60,9 µL, 0,750 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se concentró al vacío para producir el residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna C18 a escala preparatoria con un gradiente de acetonitrilo al 0-40% en agua con ácido trifluoroacético al 0,05% para obtener (S)-1-(3-((6-(3-cloro-4-hidroxifenil)-3-metilo-1H-indazol-4-il)oxi)metilo)pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona como sal de TFA (7,6 mg, 0,015 mmol, 0,98% de rendimiento). (*m/z*): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₁ClN₃O₃ 398,13 hallado 398,3.

Los compuestos de las Tablas 1-18 se prepararon con métodos sintéticos similares.

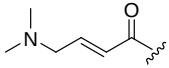
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 1

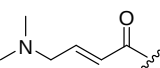
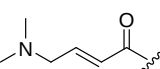


Ex N.º	R ¹	R ₂	R ³	R ₄	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	R ^k ₁	R ^k ₂	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-1		H	H	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₃	407,20	407
1-2		H	H	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃	350,13	350
1-3		Cl	H	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₃	441,15	441,1
1-4		F	H	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₃ H ₂₅ FN ₄ O ₃	425,18	425,1
1-5		F	H	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₈ FN ₃ O ₃	368,12	368
1-6		H	H	H	H	H	N	N	H	H	C ₁₈ H ₁₇ N ₅ O ₃	352,12	352,3
1-7		H	H	H	H	H	C H	N	H	H	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₃	408,18	408,2
1-8		H	H	H	H	H	C H	N	H	H	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,2
1-9		H	H	H	H	H	N	C H	H	H	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ex N.º	R ¹	R ₂	R ³	R ₄	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	R ^k ₁	R ^k ₂	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-10		H	H	H	H	H	C H	C H	M e	H	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃	421,20	421,3
1-11		H	H	H	H	H	C H	C H	M e	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364,2
1-12		H	H	H	H	H	C H	C H	H	M e	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364
1-13		F	F	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₄	386,11	386
1-14		F	H	F	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386,11	386
1-15		F	Cl	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ ClFN ₇ O ₃	402,08	402
1-16		F	H	H	M e	H	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₃	382,13	382,1
1-17		H	F	H	H	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₈ FN ₃ O ₃	368,12	368,0
1-18		H	F	H	F	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386,11	386,0
1-19		F	H	H	F	H	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386,11	386,0
1-20		H	H	H	H	Me	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364,0
1-21		H	H	H	H	NHMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,0
1-22		H	H	H	H	CH ₂ - OMe	C H	C H	H	H	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₄	394,15	394,0
1-23		F	H	H	H	Me	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₃	382,13	382,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ex N.º	R ¹	R ₂	R ³	R ₄	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	R ^k ₁	R ^k ₂	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-24		H	H	H	H	H	N	N	Me	H	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₃	366,13	366,0
1-25		H	H	H	H	CHF ₂	N	N	H	H	C ₁₉ H ₁₇ F ₂ N ₅ O ₃	402,11	402,0
1-26		H	H	H	H	H	N	CH	Me	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
1-27		F	H	H	H	H	CH	N	H	H	C ₁₉ H ₁₇ FN ₄ O ₃	369,11	369,2
1-28		F	H	H	H	H	CH	N	H	H	C ₂₂ H ₂₄ FN ₅ O ₃	426,17	426,1
1-29		F	H	H	Me	H	CH	CH	H	H	C ₂₄ H ₂₇ FN ₄ O ₃	439,19	439,1
1-30		F	H	H	F	Me	CH	CH	H	H	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	400,12	400,4
1-31		H	H	H	H	Me	N	CH	H	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
1-32		Cl	H	H	H	Me	N	CH	H	H	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	399,10	399,0
1-33		F	H	H	H	Me	N	CH	H	H	C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃	383,13	383,0
1-34		H	H	H	H	Me	CH	N	H	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
1-35		Cl	H	H	H	Me	CH	N	H	H	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	399,10	399,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Ex N.º	R ¹	R ₂	R ³	R ₄	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	R ^k ₁	R ^k ₂	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-36		F	H	H	H	Me	C H	N	H	H	C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃	383,13	383,0
1-37		Cl	H	H	H	Me	N	N	H	H	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₅ O ₃	400,09	400,0
1-38		F	H	H	H	Me	N	N	H	H	C ₁₉ H ₁₈ FN ₅ O ₃	384,12	384,0
1-39		H	H	H	H	SMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	396,11	396,4
1-40		F	H	H	H	SMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₃ S	414,11	414,0
1-41		Cl	H	H	H	SMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₃ O ₃ S	430,08	430,0
1-42		H	H	H	H	NMe ₂	C H	C H	H	H	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₃	393,17	393,0
1-43		H	H	H	H	CF ₃	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃ 3	418,11	418,4
1-44		H	H	H	H	OMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₄	380,14	380,0
1-45		H	H	H	H	CN	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₃	375,12	375,0
1-46		Cl	H	H	H	OMe	C H	C H	H	H	C ₂₁ H ₁₇ ClN ₄ O ₃ 3	409,08	409,0
1-47		H	H	H	H	Cl	C H	C H	H	H	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₃ 3	384,09	384,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

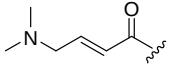
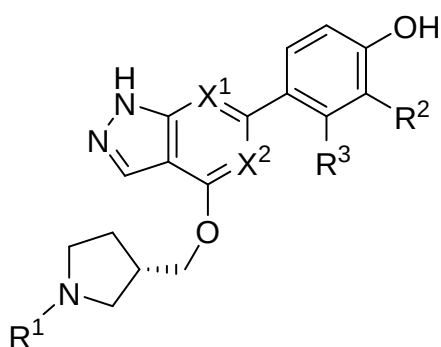
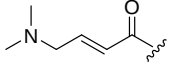
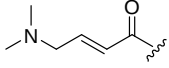
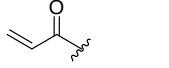
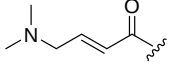
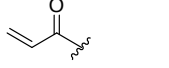
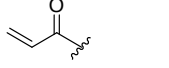
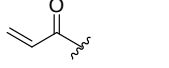
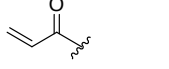
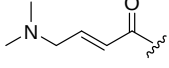
Ex N.º	R ¹	R ₂	R ³	R ₄	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	R ^k ₁	R ^k ₂	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
1-48		H	H	H	H	Cl	C H	C H	H	H	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₃	441,15	441,8

Tabla 2

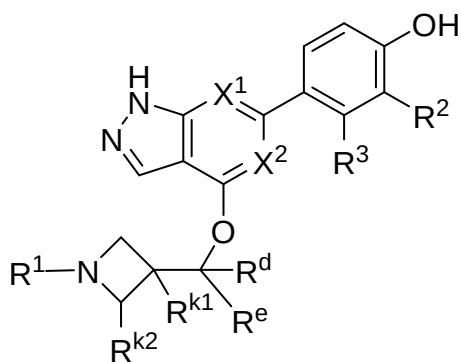


Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
2-1		H	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃	421,20	421,2
2-2		Cl	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O ₃ Cl	455,16	455,1
2-3		Cl	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	398,10	398,2
2-4		F	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₇ FN ₄ O ₃	439,19	439,3
2-5		F	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₃	382,13	382,1
2-6		H	H	N	CH	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
2-7		H	H	N	N	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₃	366,13	366,0
2-8		H	H	CH	N	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
2-9		Cl	H	CH	N	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₅ O ₃	456,16	456,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

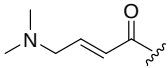
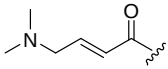
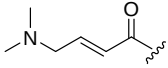
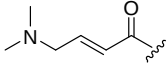
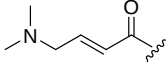
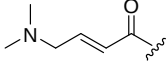
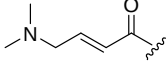
2-10		F	H	CH	N	C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃	383,13	383,0
2-11		Cl	H	N	N	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₅ O ₃	400,09	400,1
2-12		H	H	N	CH	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0
2-13		F	H	CH	N	C ₂₃ H ₂₆ FN ₅ O ₃	440,19	440,3
2-14		Cl	H	CH	N	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	399,10	399,0
2-15		F	H	N	N	C ₁₉ H ₁₈ FN ₅ O ₃	384,12	384,1
2-16		Cl	H	N	CH	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	399,10	399,1
2-17		F	H	N	CH	C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃	383,13	383,1

Tabla 3

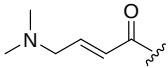
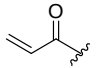
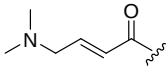
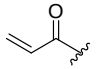
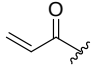
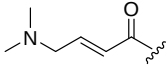
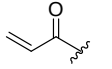
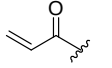
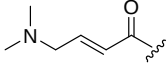
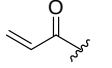
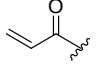
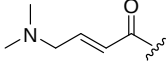
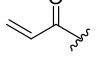
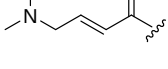
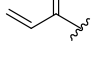


Ex N.º	R ¹	R ²	R ₃	X ¹	X ²	R ^{k1}	R ^k ₂	R ^d	R ^e	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
3-1		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃	350,13	350,2
3-2		Cl	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₃	441,15	441,3
3-3		Cl	H	C	C	H	H	H	H	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	384,09	384,1

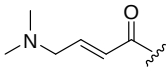
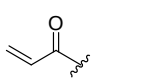
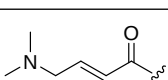
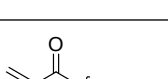
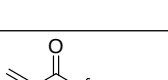
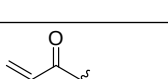
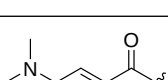
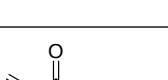
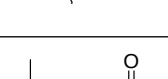
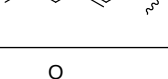
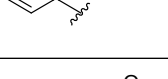
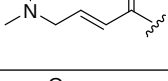
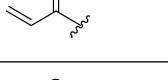
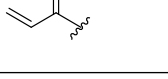
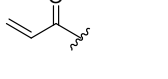
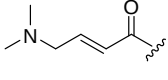
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

				H	H							
3-4		F	H	C	C	H	H	H	H	$C_{20}H_{18}FN_3O_3$	368,12	368,2
3-5		H	H	C	C	F	H	H	H	$C_{23}H_{25}FN_4O_3$	425,18	425,1
3-6		H	H	C	C	F	H	H	H	$C_{20}H_{18}FN_3O_3$	368,12	368,2
3-7		H	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{24}H_{28}N_4O_3$	421,20	421,1
3-8		H	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{21}H_{21}N_3O_3$	364,14	364,1
3-9		Cl	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{24}H_{27}ClN_4O_3$	455,16	456,1
3-10		Cl	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{21}H_{20}ClN_3O_3$	398,10	398,1
3-11		F	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{24}H_{27}FN_4O_3$	439,19	439,2
3-12		F	H	C	C	Me	H	H	H	$C_{21}H_{20}FN_3O_3$	382,13	382,1
3-13		H	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{25}H_{30}N_4O_3$	435,22	435,1
3-14		H	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,1
3-15		Cl	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{25}H_{29}ClN_4O_3$	469,18	469,1
3-16		Cl	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{22}H_{22}ClN_3O_3$	412,12	412,1
3-17		F	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{25}H_{29}FN_4O_3$	453,21	453,3
3-18		F	H	C	C	Et	H	H	H	$C_{22}H_{22}FN_3O_3$	396,15	396,1

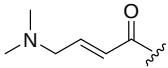
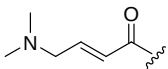
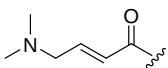
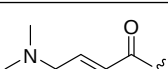
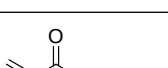
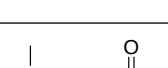
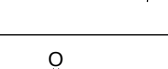
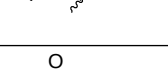
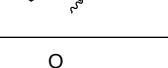
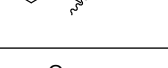
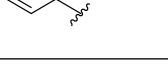
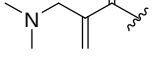
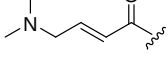
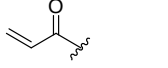
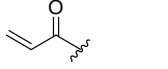
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

				H	H							
3-19		H	H	C H	C H	CN	H	H	H	$C_{24}H_{25}N_5O_3$	432,18	432,1
3-20		H	H	C H	C H	CN	H	H	H	$C_{21}H_{18}N_4O_3$	375,12	375,1
3-21		Cl	H	C H	C H	CN	H	H	H	$C_{24}H_{24}ClN_5O_3$	466,14	466,2
3-22		Cl	H	C H	C H	CN	H	H	H	$C_{21}H_{17}ClN_4O_3$	409,08	409,1
3-23		F	H	C H	C H	CN	H	H	H	$C_{21}H_{17}FN_4O_3$	393,11	393,1
3-24		H	H	C H	C H	H	H	M e	M e	$C_{25}H_{30}N_4O_3$	435,22	435,0
3-25		H	H	C H	C H	H	H	M e	M e	$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,1
3-26		Cl	H	C H	C H	H	H	M e	M e	$C_{22}H_{22}ClN_3O_3$	412,12	412,2
3-27		F	H	C H	C H	H	H	M e	M e	$C_{25}H_{29}FN_4O_3$	453,21	453,2
3-28		F	H	C H	C H	H	H	M e	M e	$C_{22}H_{22}FN_3O_3$	393,15	396,3
3-29		H	H	C H	N	H	H	H	H	$C_{19}H_{18}N_4O_3$	351,12	351,0
3-30		H	H	C H	C H	H	Me	H	H	$C_{24}H_{28}N_4O_3$	421,20	421,2
3-31		H	H	N	N	H	Me	H	H	$C_{19}H_{19}N_5O_3$	366,13	366,1
3-32		H	H	C H	C H	OM e	H	H	H	$C_{24}H_{28}N_4O_4$	437,20	437,3
3-33		H	H	C H	C H	OM e	H	H	H	$C_{21}H_{21}N_3O_4$	380,14	380,2

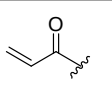
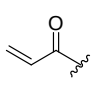
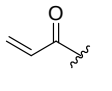
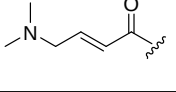
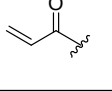
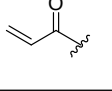
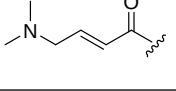
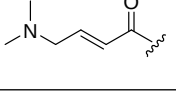
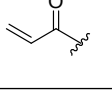
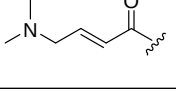
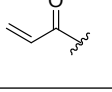
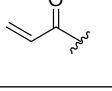
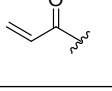
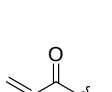
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

3-34		Cl	H	C H	N	H	H	H	H	$C_{22}H_{24}ClN_5O_3$	442,14	442,1
3-35		Cl	H	C H	N	H	H	H	H	$C_{19}H_{17}ClN_4O_3$	385,08	385,0
3-36		F	H	C H	N	H	H	H	H	$C_{22}H_{24}FN_5O_3$	426,17	426,0
3-37		F	H	C H	N	H	H	H	H	$C_{19}H_{17}FN_4O_3$	369,11	369,1
3-38		Cl	H	N	N	H	H	H	H	$C_{18}H_{16}ClN_5O_3$	386,08	386,2
3-39		F	H	N	N	H	H	H	H	$C_{18}H_{16}FN_5O_3$	370,11	370,1
3-40		F	H	C H	C H	F	H	H	H	$C_{23}H_{24}F_2N_4O_3$	443,17	443,1
3-41		F	H	C H	C H	F	H	H	H	$C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$	386,11	386,2
3-42		Cl	H	C H	C H	F	H	H	H	$C_{23}H_{24}ClFN_4O_3$	459,14	459,1
3-43		Cl	H	C H	C H	F	H	H	H	$C_{20}H_{17}ClFN_3O_3$	402,08	402,0
3-44		H	H	C H	N	F	H	H	H	$C_{22}H_{24}FN_5O_3$	426,17	426,2
3-45		H	H	N	N	F	H	H	H	$C_{18}H_{16}FN_5O_3$	370,11	370,1
3-46		H	H	N	C H	F	H	H	H	$C_{19}H_{17}FN_4O_3$	369,11	369,3
3-47		Cl	H	C H	N	F	H	H	H	$C_{19}H_{16}ClFN_4O_3$	403,07	403,0
3-48		F	H	C H	N	F	H	H	H	$C_{22}H_{23}F_2N_5O_3$	444,16	444,0
3-49		F	H	C	N	F	H	H	H	$C_{19}H_{16}F_2N_4O_3$	387,10	387,0

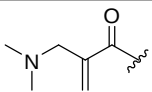
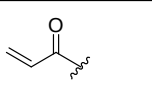
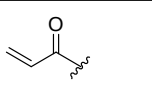
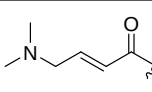
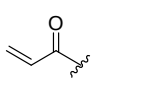
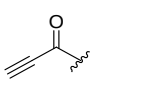
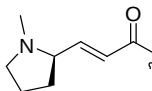
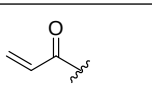
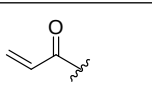
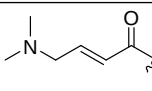
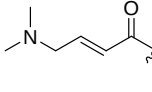
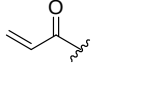
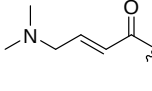
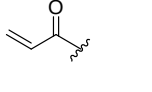
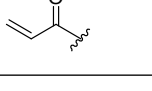
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

				H								
3-50		Cl	H	N	N	F	H	H	H	$C_{21}H_{22}ClFN_6O_3$	461,13	461,1
3-51		F	H	N	N	F	H	H	H	$C_{21}H_{22}F_2N_6O_3$	445,16	445,2
3-52		Cl	H	N	C H	F	H	H	H	$C_{22}H_{23}ClFN_5O_3$	460,13	460,1
3-53		F	H	N	C H	F	H	H	H	$C_{22}H_{23}F_2N_5O_3$	444,16	444,2
3-54		F	H	N	C H	F	H	H	H	$C_{19}H_{16}F_2N_4O_3$	387,10	387,1
3-55		H	H	C H	N	Me	H	H	H	$C_{23}H_{27}N_5O_3$	422,20	422,2
3-56		H	H	C H	N	Me	H	H	H	$C_{20}H_{20}N_4O_3$	365,14	365,2
3-57		H	H	N	N	Me	H	H	H	$C_{19}H_{19}N_5O_3$	366,13	366,1
3-58		H	H	N	C H	Me	H	H	H	$C_{20}H_{20}N_4O_3$	365,14	365,2
3-59		F	H	C H	N	Me	H	H	H	$C_{20}H_{19}FN_4O_3$	383,13	383,3
3-60		Cl	H	N	N	H	H	H	H	$C_{21}H_{23}ClN_6O_3$	443,14	443,1
3-61		H	H	C H	N	Et	H	H	H	$C_{24}H_{29}N_5O_3$	436,21	436,1
3-62		H	H	C H	N	Et	H	H	H	$C_{21}H_{22}N_4O_3$	379,15	379,0
3-63		H	H	N	N	Et	H	H	H	$C_{20}H_{21}N_5O_3$	380,15	380,2
3-64		H	H	C H	N	Et	H	H	H	$C_{24}H_{29}N_5O_3$	436,21	436,1

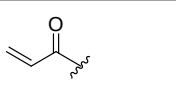
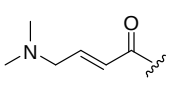
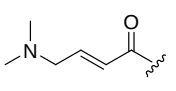
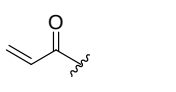
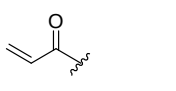
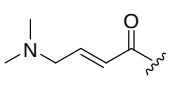
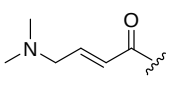
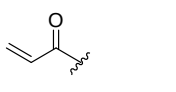
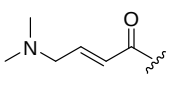
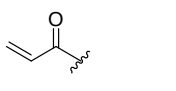
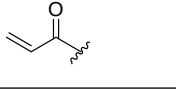
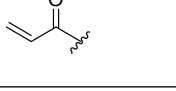
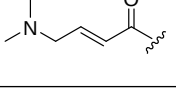
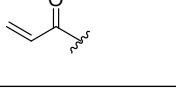
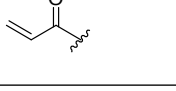
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

3-65		H	H	C H	N	Et	H	H	H	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,0
3-66		Cl	H	C H	N	Et	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₃	413,11	413,1
3-67		F	H	N	N	Et	H	H	H	C ₂₀ H ₂₀ FN ₅ O ₃	398,14	398,1
3-68		Cl	H	N	C H	Et	H	H	H	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₅ O ₃	470,17	470,2
3-69		Cl	H	N	C H	Et	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₃	413,11	413,2
3-70		F	H	N	C H	Et	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₃	397,14	397,2
3-71		Cl	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₃ H ₂₃ ClN ₆ O ₃	467,14	467,0
3-72		Cl	H	C H	C H	OM e	H	H	H	C ₂₄ H ₂₇ ClN ₄ O ₄	471,16	471,2
3-73		Cl	H	C H	C H	OM e	H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₃ O ₄	414,10	414,2
3-74		F	H	C H	C H	OM e	H	H	H	C ₂₄ H ₂₇ FN ₄ O ₄	455,19	455,1
3-75		F	H	C H	C H	OM e	H	H	H	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₄	398,13	398,2
3-76		H	H	N	N	OM e	H	H	H	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₄	382,13	382,1
3-77		H	H	N	N	H	H	H	M e	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₃	366,13	366,1
3-78		H	H	N	N	H	H	H	M e (S)	C ₁₉ H ₁₉ N ₅ O ₃	366,13	366,1

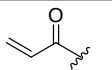
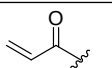
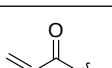
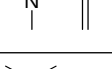
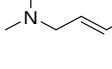
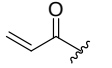
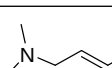
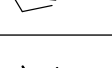
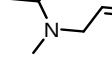
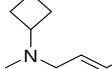
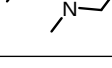
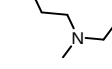
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

3-79		H	H	N	C H	H	H	H	H	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₃	408,18	408,1
3-80		Cl	H	N	C H	H	H	M e	M e	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₃	413,11	413,2
3-81		F	H	N	C H	H	H	M e	M e	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₃	397,14	397,1
3-82		F	F	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₃ H ₂₄ F ₂ N ₄ O ₃	443,17	443,7
3-83		OM e	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₄	380,14	380,0
3-84		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	348,11	348,1
3-85		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₃	433,20	433,1
3-86		Cl	H	N	C H	H	H	H	H	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ O ₃	385,08	385,1
3-87		F	H	N	C H	H	H	H	H	C ₁₉ H ₁₇ FN ₄ O ₃	369,11	369,1
3-88		H	H	N	N	F	H	H	H	C ₂₁ H ₂₃ FN ₆ O ₃	427,17	427,2
3-89		H	H	N	C H	F	H	H	H	C ₂₂ H ₂₄ FN ₅ O ₃	426,17	426,2
3-90		H	H	C H	N	F	H	H	H	C ₁₉ H ₁₇ FN ₄ O ₃	369,11	369,1
3-91		Cl	H	C H	N	F	H	H	H	C ₂₂ H ₂₃ ClFN ₅ O ₃	460,13	460,0
3-92		Cl	H	N	N	F	H	H	H	C ₁₈ H ₁₅ ClFN ₅ O ₃	404,07	404,1
3-93		F	H	N	N	F	H	H	H	C ₁₈ H ₁₅ F ₂ N ₅ O ₃	388,10	388,1

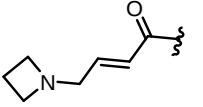
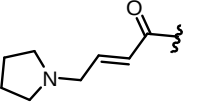
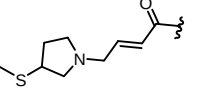
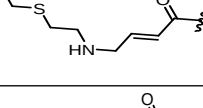
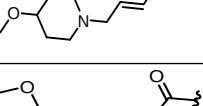
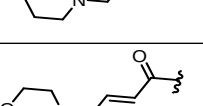
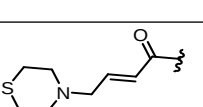
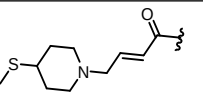
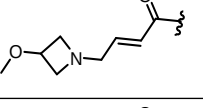
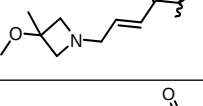
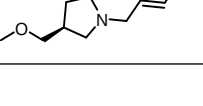
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

3-94		Cl	H	N	C H	F	H	H	H	C ₁₉ H ₁₆ ClFN ₄ O ₃	403,07	403,1
3-95		Cl	H	C H	N	Me	H	H	H	C ₂₃ H ₂₆ ClN ₅ O ₃	456,16	456,2
3-96		F	H	C H	N	Me	H	H	H	C ₂₃ H ₂₆ FN ₅ O ₃	440,19	440,2
3-97		Cl	H	C H	N	Me	H	H	H	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃	399,10	399,2
3-98		F	H	N	C H	Me	H	H	H	C ₂₀ H ₁₉ FN ₄ O ₃	383,13	383,2
3-99		Cl	H	C H	N	Et	H	H	H	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₅ O ₃	470,17	470,1
3-100		F	H	C H	N	Et	H	H	H	C ₂₄ H ₂₈ FN ₅ O ₃	454,20	454,2
3-101		F	H	C H	N	Et	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₃	397,14	397,2
3-102		H	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₃ H ₂₄ N ₆ O ₃	433,18	433,2
3-103		H	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ N ₅ O ₃	376,12	376,2
3-104		H	H	N	N	CN	H	H	H	C ₁₉ H ₁₆ N ₆ O ₃	377,11	377,0
3-105		H	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₀ H ₁₇ N ₅ O ₃	376,12	376,2
3-106		F	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₃ H ₂₃ FN ₆ O ₃	451,17	451,1
3-107		Cl	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₃	410,08	410,1
3-108		F	H	C H	N	CN	H	H	H	C ₂₀ H ₁₆ FN ₅ O ₃	394,11	394,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

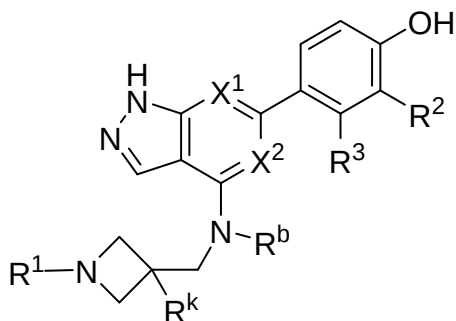
3-109		Cl	H	N	N	CN	H	H	H	$C_{19}H_{15}ClN_6O_3$	411,07	411,1
3-110		F	H	N	N	CN	H	H	H	$C_{19}H_{15}FN_6O_3$	395,10	395,1
3-111		F	H	N	C H	CN	H	H	H	$C_{20}H_{16}FN_5O_3$	394,11	394,1
3-112		H	H	N	N	H	H	H	H	$C_{21}H_{24}N_6O_3$	409,18	409,1
3-113		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{25}H_{30}N_4O_3$	435,22	435,1
3-114		H	H	C H	C H	H	Me	H	H	$C_{21}H_{21}N_3O_3$	364,14	364,1
3-115		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{25}H_{28}N_4O_3$	433,20	433,1
3-116		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{26}H_{32}N_4O_3$	449,23	449,2
3-117		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{26}H_{30}N_4O_3$	447,22	
3-118		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{26}H_{32}N_4O_3$	449,23	449,2
3-119		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{25}H_{30}N_4O_4$	451,21	451,1
3-120		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{27}H_{34}N_4O_5$	495,24	
3-121		H	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{26}H_{32}N_4O_5$	481,22	
3-122		Cl	H	C H	C H	H	H	H	H	$C_{23}H_{25}ClN_4O_3$	441,15	441,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

3-123		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₃	419,18	419,1
3-124		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₃	433,20	
3-125		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₃ S	479,19	479,2
3-126		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₃₀ N ₄ O ₃ S	467,18	
3-127		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	477,23	
3-128		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	477,23	477,2
3-129		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₄	449,20	449,1
3-130		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₃ S	465,17	465,1
3-131		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₃ S	493,20	493,2
3-132		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₄	449,20	
3-133		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₆ H ₃₀ N ₄ O ₄	463,21	463,2
3-134		H	H	C H	C H	H	H	H	H	C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄	477,23	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

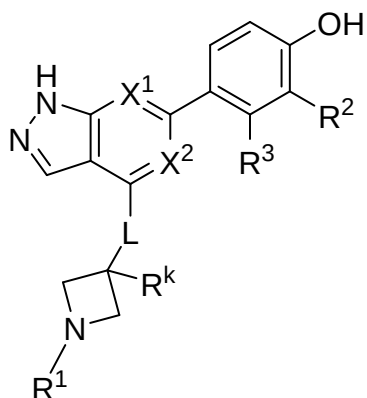
Tabla 4



Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	R ^b	R ^k	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
4-1		H	H	Me	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₂	363,15	363,1
4-2		H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₂	363,15	363
4-3		H	H	H	H	CH	CH	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₂	349,14	349,1
4-4		Cl	H	Me	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₅ O ₂	454,18	454,1
4-5		Cl	H	Me	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₂	397,12	397,0
4-6		F	H	Me	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₈ FN ₅ O ₂	438,21	438,1
4-7		F	H	Me	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₂	481,15	381,0
4-8		H	H	Me	H	CH	N	C ₂₃ H ₂₈ N ₆ O ₂	421,21	421,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 5



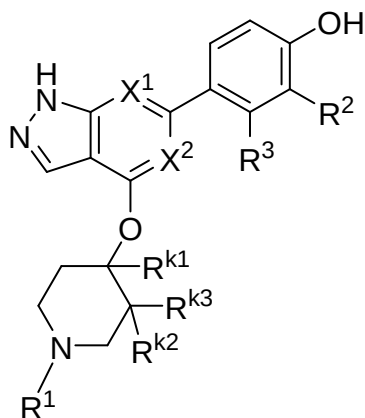
Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	R ^k	L	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
5-1		H	H	CH	CH	H	O	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₃	393,17	393,4
5-2		H	H	CH	CH	H	O	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	336,11	336,2
5-3		Cl	H	CH	CH	H	O	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₄ O ₃	427,13	427,1
5-4		Cl	H	CH	CH	H	O	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	370,07	370,1
5-5		F	H	CH	CH	H	O	C ₂₂ H ₂₃ FN ₄ O ₃	411,16	411,3
5-6		F	H	CH	CH	H	O	C ₁₉ H ₁₆ FN ₃ O ₃	354,10	354,2
5-7		H	H	CH	CH	H	NH	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂	335,12	335,2
5-8		H	H	CH	CH	H	NMe	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₂	406,20	406,1
5-9		H	H	CH	CH	H	NMe	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₂	349,14	349,1
5-10		H	H	CH	CH	CHF ₂	O	C ₂₃ H ₂₄ F ₂ N ₄ O ₃	443,17	443,1
5-11		H	H	CH	CH	Me	O	C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₃	407,18	407,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

5-12		H	H	CH	CH	Me	O	$C_{20}H_{19}N_3O_3$	350,13	350,1
5-13		H	H	CH	CH		O	$C_{25}H_{28}N_4O_3$	433,20	433,2
5-14		H	H	CH	CH	CHF_2	O	$C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$	386,11	386,0
5-15		H	H	N	CH	H	O	$C_{18}H_{16}N_4O_3$	337,11	337,1
5-16		Cl	H	CH	CH	CHF_2	O	$C_{23}H_{23}ClF_2N_4O_3$	477,13	477,1
5-17		F	H	CH	CH	CHF_2	O	$C_{23}H_{23}F_3N_4O_3$	461,16	461,2
5-18		Cl	H	CH	CH	Me	O	$C_{23}H_{25}ClN_4O_3$	441,15	441,2
5-19		F	H	CH	CH	Me	O	$C_{23}H_{25}FN_4O_3$	425,18	425,3
5-20		H	H	N	N	H	O	$C_{17}H_{15}N_5O_3$	338,10	338,2
5-21		Cl	H	CH	CH	CHF_2	O	$C_{20}H_{16}ClF_2N_3O_3$	420,07	420,0
5-22		F	H	CH	CH	CHF_2	O	$C_{20}H_{16}F_3N_3O_3$	404,10	404,1
5-23		Cl	H	CH	CH	Me	O	$C_{20}H_{18}ClN_3O_3$	384,09	384,2
5-24		F	H	CH	CH	Me	O	$C_{20}H_{18}FN_3O_3$	368,12	368,1
5-25		H	H	CH	CH	CF_3	O	$C_{23}H_{23}F_3N_4O_3$	461,16	461,2
5-26		H	H	CH	CH	CF_3	O	$C_{20}H_{16}F_3N_3O_3$	404,10	404,1

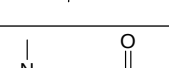
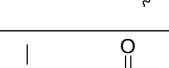
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 6



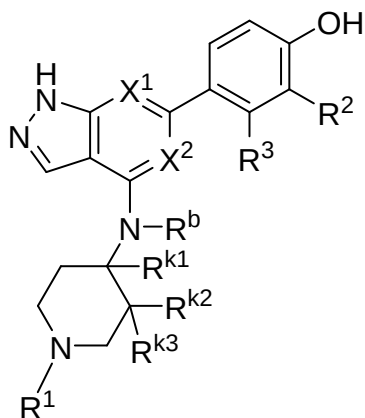
Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	R ^{k1}	R ^{k2}	R ^{k3}	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
6-1		H	H	CH	CH	H	H	H	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃	421,20	421,2
6-2		H	H	CH	CH	H	H	H	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364,2
6-3		H	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₃	378,16	378,1
6-4		Cl	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₅ H ₂₉ ClN ₄ O ₃	469,18	469,2
6-5		Cl	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₃	412,12	412,2
6-6		F	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₅ H ₂₉ FN ₄ O ₃	453,21	453,2
6-7		F	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₂ H ₂₂ FN ₃ O ₃	396,15	396,1
6-8		H	H	CH	CH	H	F	F	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	400,12	400,0
6-9		H	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₅ H ₃₀ N ₄ O ₃	435,22	435,2
6-10		H	H	CH	CH	Me	H	H	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₃	378,16	378,1
6-11		H	H	N	CH	H	H	H	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₃	365,14	365,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

6-12		H	H	N	N	H	H	H	$C_{19}H_{19}N_5O_3$	366,13	366,1
6-13		Cl	H	CH	CH	H	H	H	$C_{21}H_{20}ClN_3O_3$	398,10	398,1
6-14		F	H	CH	CH	H	H	H	$C_{21}H_{20}FN_3O_3$	382,13	382,1
6-15		H	H	CH	N	H	H	H	$C_{21}H_{20}N_4O_3$	365,14	365,1
6-16		F	H	CH	N	H	H	H	$C_{20}H_{19}FN_4O_3$	383,13	383,0
6-17		Cl	H	N	CH	H	H	H	$C_{20}H_{19}ClN_4O_3$	399,10	399,3
6-18		F	H	N	CH	H	H	H	$C_{20}H_{19}FN_4O_3$	383,13	383,0
6-19		Cl	H	CH	CH	H	H	H	$C_{24}H_{27}ClN_4O_3$	455,16	455,2
6-20		F	H	CH	CH	H	H	H	$C_{24}H_{27}FN_4O_3$	439,19	439,1
6-21		Cl	H	CH	N	H	H	H	$C_{20}H_{19}ClN_4O_3$	399,10	399,1
6-22		Cl	H	N	N	H	H	H	$C_{19}H_{18}ClN_5O_3$	400,09	400,1
6-23		F	H	N	N	H	H	H	$C_{19}H_{18}FN_5O_3$	384,12	384,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 7



Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	R ^{k1}	R ^{k2}	R ^{k3}	R ^b	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
7-1		H	H	CH	CH	Me	H	H	H	C ₂₅ H ₃₁ N ₅ O ₂	434,22	434,2
7-2		H	H	CH	CH	Me	H	H	H	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₂	377,17	377,3
7-3		H	H	CH	CH	H	H	H	Me	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₂	377,17	377
7-4		H	H	CH	CH	H	H	H	H	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₂	363,15	363
7-5		H	H	CH	CH	H	F	F	H	C ₂₄ H ₂₇ F ₂ N ₅ O ₂	456,19	456,2
7-6		H	H	CH	CH	H	F	F	H	C ₂₁ H ₂₀ F ₂ N ₄ O ₂	399,13	399,2
7-7		Cl	H	CH	CH	H	H	H	Me	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₄ O ₂	411,14	411,2
7-8		Cl	H	CH	CH	Me	H	H	H	C ₂₅ H ₃₀ ClN ₅ O ₂	468,19	468,2
7-9		F	H	CH	CH	Me	H	H	H	C ₂₂ H ₂₃ FN ₄ O ₂	395,16	395,1
7-10		F	H	CH	CH	H	H	H	Me	C ₂₂ H ₂₃ FN ₄ O ₂	395,16	395,3
7-11		Cl	H	CH	CH	Me	H	H	H	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₄ O ₂	411,13	411,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

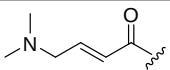
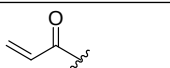
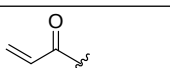
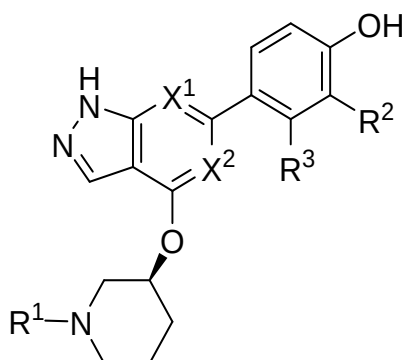
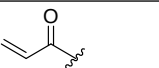
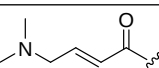
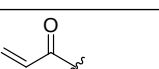
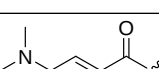
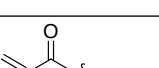
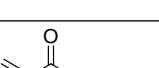
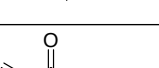
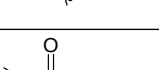
7-12		F	H	CH	CH	Me	H	H	H	$C_{25}H_{30}FN_5O_2$	452,21	452,2
7-13		H	H	CH	N	Me	H	H	H	$C_{21}H_{23}N_5O_2$	378,16	378,2
7-14		Cl	H	CH	N	Me	H	H	H	$C_{21}H_{22}ClN_5O_2$	412,12	412,2

Tabla 8



Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
8-1		H	H	CH	CH	$C_{21}H_{21}N_3O_3$	364,14	364
8-2		Cl	H	CH	CH	$C_{24}H_{27}ClN_4O_3$	455,16	455,1
8-3		Cl	H	CH	CH	$C_{21}H_{20}ClN_3O_3$	398,10	398,0
8-4		F	H	CH	CH	$C_{24}H_{27}FN_4O_3$	439,19	439,2
8-5		F	H	CH	CH	$C_{21}H_{20}FN_3O_3$	382,13	382,0
8-6		H	H	N	CH	$C_{20}H_{20}FN_4O_3$	365,14	365,1
8-7		H	H	CH	N	$C_{20}H_{20}N_4O_3$	365,14	365,1
8-8		F	H	N	CH	$C_{20}H_{19}FN_4O_3$	383,13	383,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

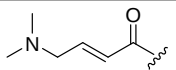
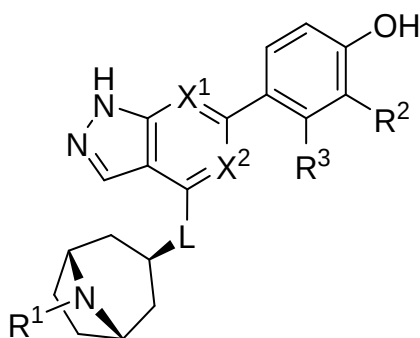
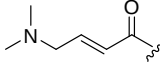
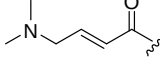
8-9		F	H	CH	N	$C_{23}H_{26}FN_5O_3$	440,19	440,2
8-10		Cl	H	CH	N	$C_{20}H_{19}ClN_4O_3$	399,10	399,1
8-11		F	H	CH	N	$C_{20}H_{19}FN_4O_3$	383,13	383,1
8-12		Cl	H	N	N	$C_{19}H_{18}ClN_5O_3$	400,09	400,2
8-13		F	H	N	N	$C_{19}H_{18}FN_5O_3$	384,12	384,0
8-14		Cl	H	N	CH	$C_{20}H_{19}ClN_4O_3$	399,10	399,0

Tabla 9

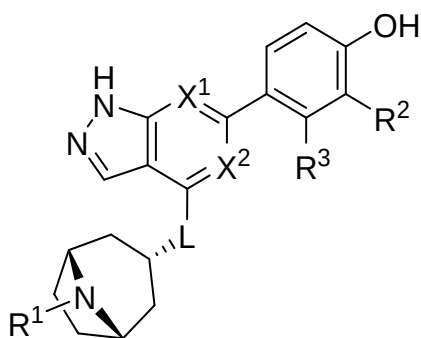


Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	L	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
9-1		H	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{23}N_3O_3$	390,16	390,1
9-2		Cl	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{22}ClN_3O_3$	424,12	424,0
9-3		Cl	H	CH	CH	O	$C_{26}H_{29}ClN_4O_3$	481,18	481,1
9-4		F	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{22}FN_3O_3$	408,15	408,1
9-5		F	H	CH	CH	O	$C_{26}H_{29}FN_4O_3$	465,21	465,1
9-6		H	H	CH	N	O	$C_{22}H_{22}N_4O_3$	391,15	391,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

9-7		Cl	H	CH	N	O	$C_{22}H_{21}ClN_4O_3$	425,11	425,0
9-8		Cl	H	CH	N	O	$C_{25}H_{28}ClN_5O_3$	482,17	482,1
9-9		H	H	CH	CH	NH	$C_{23}H_{24}N_4O_2$	389,17	389,2
9-10		F	H	CH	N	O	$C_{22}H_{21}FN_4O_3$	409,14	409,0
9-11		H	H	N	N	O	$C_{22}H_{21}N_5O_3$	392,15	392,2

Tabla 10

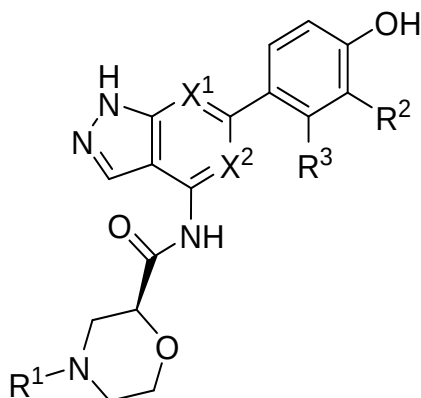


Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	L	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
10-1		H	H	CH	CH	O	$C_{26}H_{30}N_4O_3$	447,22	447,2
10-2		H	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{23}N_3O_3$	390,16	390,2
10-3		Cl	H	CH	CH	O	$C_{26}H_{29}ClN_4O_3$	481,18	481,3
10-4		Cl	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{22}ClN_3O_3$	424,12	424,2
10-5		F	H	CH	CH	O	$C_{26}H_{29}FN_4O_3$	465,21	465,2
10-6		F	H	CH	CH	O	$C_{23}H_{22}FN_3O_3$	408,15	408,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

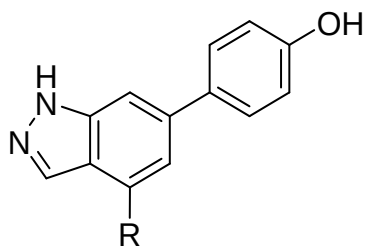
10-7		H	H	CH	CH	NH	$C_{23}H_{24}N_4O_2$	389,17	389,3
------	---	---	---	----	----	----	----------------------	--------	-------

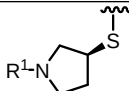
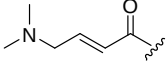
Tabla 11



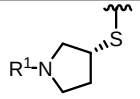
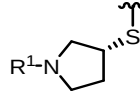
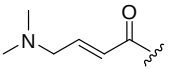
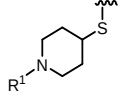
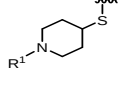
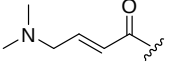
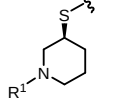
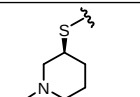
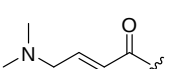
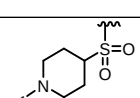
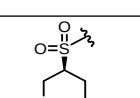
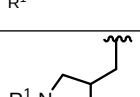
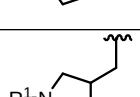
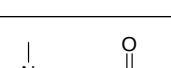
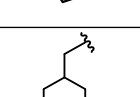
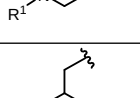
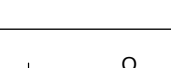
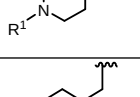
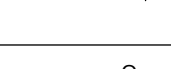
Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
11-1		H	H	CH	CH	$C_{21}H_{20}N_4O_4$	393,12	393,1
11-2		H	H	CH	CH	$C_{24}H_{27}N_5O_4$	450,18	450,2

Tabla 12

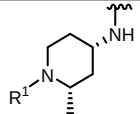
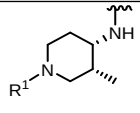
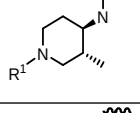
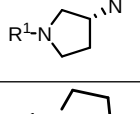
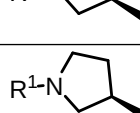
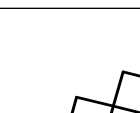
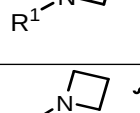
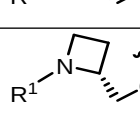
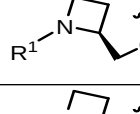
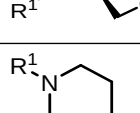
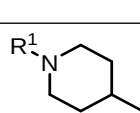
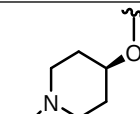


Ex N.º	R	R ¹	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
12-1			$C_{23}H_{26}N_4O_2$ S	423,16	423,1

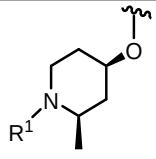
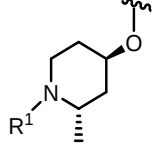
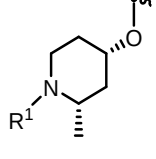
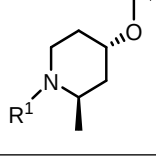
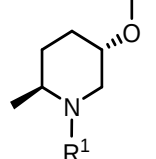
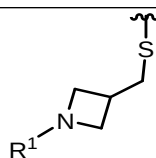
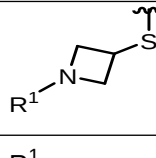
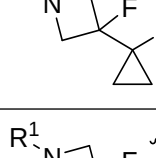
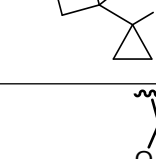
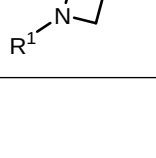
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-2			$C_{20}H_{19}N_3O_2$ S	366,10	366,2
12-3			$C_{23}H_{26}N_4O_2$ S	423,16	423,2
12-4			$C_{21}H_{21}N_3O_2$ S	380,12	380,3
12-5			$C_{24}H_{28}N_4O_2$ S	437,18	437,2
12-6			$C_{21}H_{21}N_3O_2$ S	380,12	380,2
12-7			$C_{24}H_{28}N_4O_2$ S	437,18	437,2
12-8			$C_{21}H_{21}N_3O_4$ S	412,11	412,1
12-9			$C_{21}H_{21}N_3O_4$ S	412,11	412,1
12-10 (racemic)			$C_{21}H_{21}N_3O_2$	348,15	348,2
12-11 (racemic)			$C_{24}H_{28}N_4O_2$	405,21	405,2
12-12 (racemic)			$C_{22}H_{23}N_3O_2$	362,16	362,3
12-13 (racemic)			$C_{25}H_{30}N_4O_2$	419,22	419,2
12-14			$C_{25}H_{30}N_4O_2$	149,22	419,2

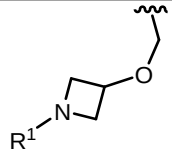
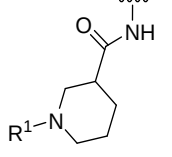
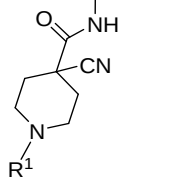
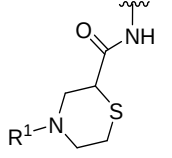
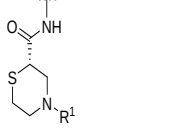
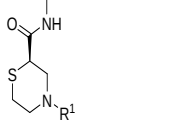
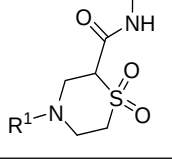
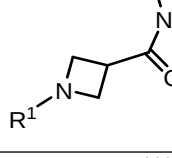
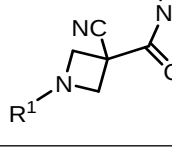
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-15			$C_{22}H_{24}N_4O_2$	377,17	377
12-16			$C_{22}H_{24}N_4O_2$	377,17	377,2
12-17			$C_{22}H_{24}N_4O_2$	377,17	377,3
12-18			$C_{20}H_{20}N_4O_2$	349,14	349,2
12-19			$C_{24}H_{28}N_4O_3$	421,20	421,3
12-20			$C_{21}H_{21}N_3O_3$	364,14	364,2
12-21			$C_{22}H_{21}N_3O_3$	376,14	376,4
12-22			$C_{23}H_{26}N_4O_3$	407,18	407,1
12-23			$C_{20}H_{19}N_3O_3$	350,13	350,1
12-24			$C_{23}H_{26}N_4O_3$	407,18	407,2
12-25			$C_{20}H_{19}N_3O_3$	350,13	350,2
12-26			$C_{25}H_{30}N_4O_3$	435,22	435,1
12-27			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,1
12-28			$C_{25}H_{30}N_4O_3$	435,22	435,2

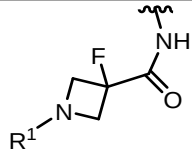
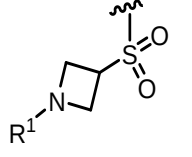
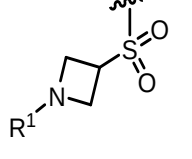
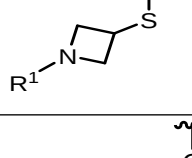
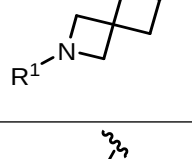
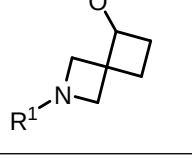
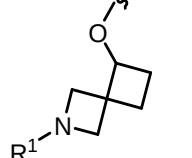
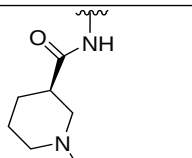
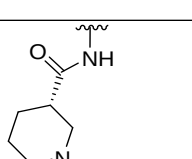
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-29			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,2
12-30			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,2
12-31			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,2
12-32			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,1
12-33			$C_{22}H_{23}N_3O_3$	378,16	378,2
12-34			$C_{20}H_{19}N_3O_2$ S	366,10	366,1
12-35			$C_{19}H_{17}N_3O_2$ S	352,09	352,3
12-36			$C_{25}H_{27}FN_4$ O_3	451,19	451,2
12-37			$C_{22}H_{20}FN_3$ O_3	394,13	394,2
12-38			$C_{23}H_{26}N_4O_3$	407,18	407,3

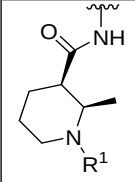
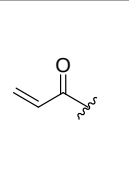
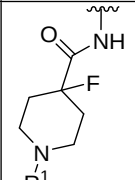
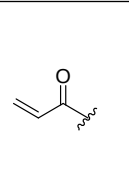
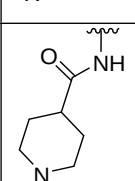
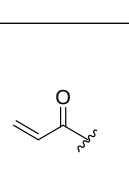
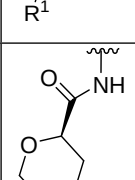
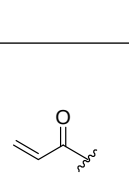
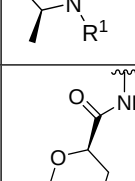
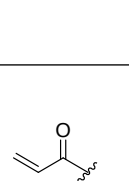
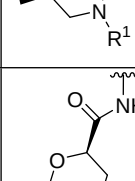
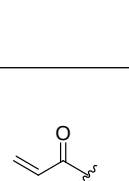
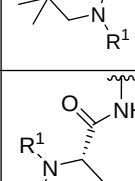
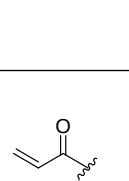
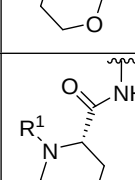
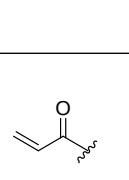
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-39			$C_{20}H_{19}N_3O_3$	350,13	350,1
12-40			$C_{22}H_{22}N_4O_3$	391,15	391,1
12-41			$C_{23}H_{21}N_5O_3$	416,14	416,1
12-42			$C_{21}H_{20}N_4O_3$ S	409,10	409,1
12-43			$C_{21}H_{20}N_4O_3$ S	409,10	409,3
12-44			$C_{21}H_{20}N_4O_3$ S	409,10	409,3
12-45			$C_{21}H_{20}N_4O_5$ S	441,09	441,1
12-46			$C_{20}H_{18}N_4O_3$	363,11	363,1
12-47			$C_{21}H_{17}N_5O_3$	388,11	388,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-48			$C_{20}H_{17}FN_4$ O_3	381,10	381,0
12-49			$C_{22}H_{24}N_4O_4$ S	441,14	441,2
12-50			$C_{19}H_{17}N_3O_4$ S	384,08	384,0
12-51			$C_{22}H_{24}N_4O_2$ S	409,15	409,3
12-52			$C_{25}H_{28}N_4O_3$	433,20	433,2
12-53			$C_{25}H_{28}N_4O_3$	433,20	433,5
12-54			$C_{22}H_{21}N_3O_3$	376,14	376,5
12-55			$C_{22}H_{22}N_4O_3$	391,15	391,1
12-56			$C_{22}H_{22}N_4O_3$	391,15	391,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

12-57			$C_{23}H_{24}N_4O_3$	405,16	405,2
12-58			$C_{22}H_{21}FN_4O_3$	409,14	409,3
12-59			$C_{22}H_{22}N_4O_3$	391,15	391,1
12-60			$C_{22}H_{22}N_4O_4$	407,14	407,1
12-61			$C_{22}H_{22}N_4O_4$	407,14	407,1
12-62			$C_{23}H_{24}N_4O_4$	421,16	421,1
12-63			$C_{21}H_{20}N_4O_4$	393,12	393,1
12-64			$C_{21}H_{20}N_4O_3$ S	409,10	409,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

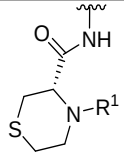
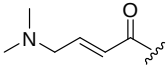
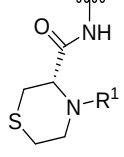
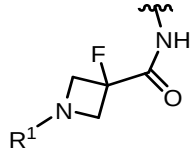
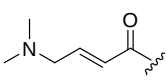
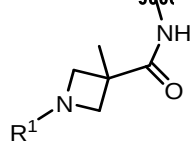
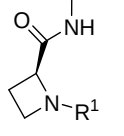
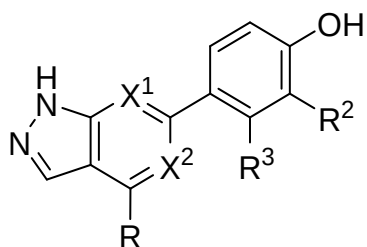
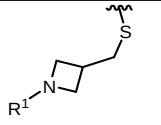
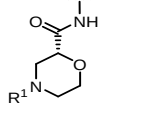
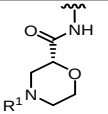
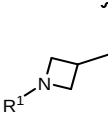
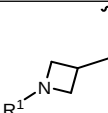
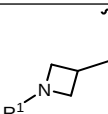
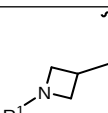
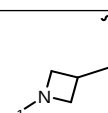
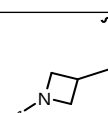
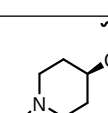
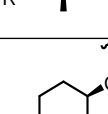
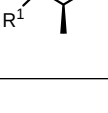
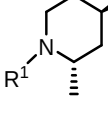
12-65			$C_{24}H_{27}N_5O_3$ S	466,16	466,1
12-66			$C_{21}H_{20}N_4O_3$ S	409,10	409,1
12-67			$C_{23}H_{24}FN_5$ O_3	438,16	438,1
12-68			$C_{21}H_{20}N_4O_3$	377,13	377,1
12-69			$C_{20}H_{18}N_4O_3$	363,11	363,0

Tabla 13

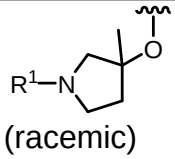
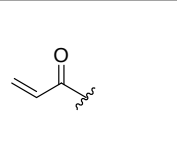
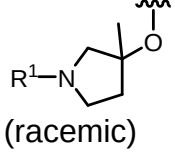
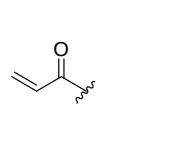
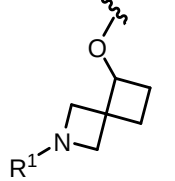
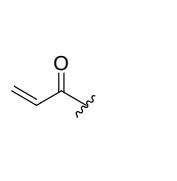
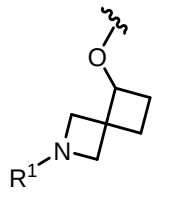
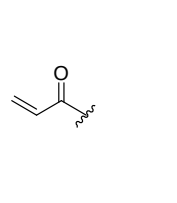
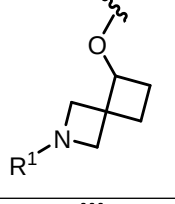
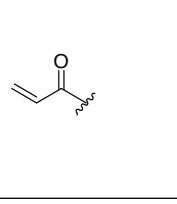
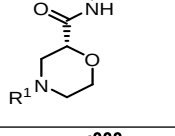
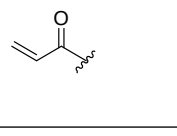
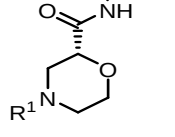
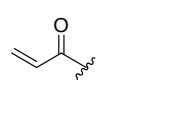
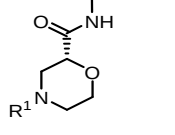
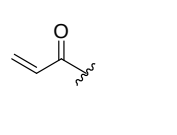
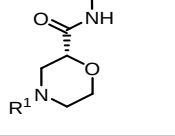
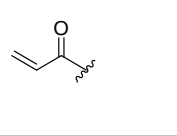


Ex N.º	R	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado o [M+H] ⁺
13-1			Cl	H	N	CH	$C_{19}H_{17}ClN_4O_2$ S	401,06	401,1
13-2			Cl	H	CH	CH	$C_{21}H_{19}ClN_4O_4$	427,09	427,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

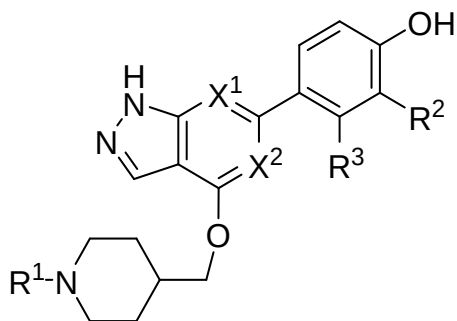
13-3			F	H	CH	CH	C ₂₁ H ₁₉ FN ₄ O ₄	411,12	411,0
13-4			H	H	CH	CH	C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₂ S	423,16	423,1
13-5			F	H	CH	CH	C ₂₃ H ₂₅ FN ₄ O ₂ S	441,15	441,2
13-6			Cl	H	CH	CH	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₂ S	457,12	457,1
13-7			F	H	CH	CH	C ₂₀ H ₁₈ FN ₃ O ₂ S	384,09	384,1
13-8			Cl	H	CH	CH	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ S	400,07	400,1
13-9			H	H	N	CH	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂ S	367,10	367,0
13-10			H	H	CH	CH	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₃	380,15	380,2
13-11			H	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,0
13-12			H	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,0
13-13			H	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,0

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

13-14	 (racemic)		H	Cl	CH	CH	$C_{21}H_{20}ClN_3O_3$	398,10	398,3
13-15	 (racemic)		H	H	CH	CH	$C_{21}H_{21}N_3O_3$	364,14	364,5
13-16			H	H	N	N	$C_{20}H_{19}N_5O_3$	378,13	378,5
13-17			Cl	H	N	N	$C_{20}H_{18}ClN_5O_3$	412,09	412,4
13-18			F	H	N	N	$C_{20}H_{18}FN_5O_3$	396,12	396,2
13-19			H	H	N	CH	$C_{20}H_{19}N_5O_4$	394,12	394,1
13-20			Cl	H	CH	N	$C_{20}H_{18}ClN_5O_4$	428,08	428,0
13-21			F	H	CH	N	$C_{20}H_{18}FN_5O_4$	412,11	412,1
13-22			Cl	H	N	CH	$C_{20}H_{18}ClN_5O_4$	428,08	428

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 14

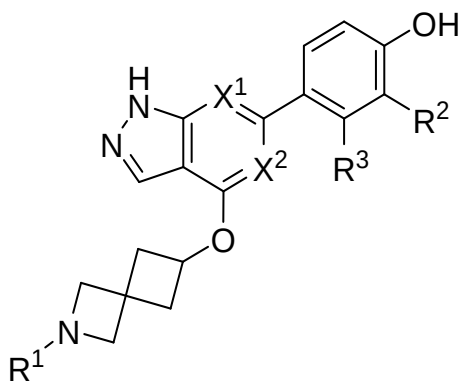


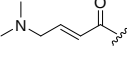
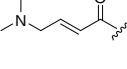
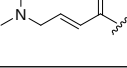
Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
14-1		Cl	H	CH	CH	C ₂₂ H ₂₂ ClN ₃ O ₃	412,12	412,0
14-2		H	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,1
14-3		Cl	H	CH	CH	C ₂₅ H ₂₉ ClN ₄ O ₃	469,18	469,1
14-4		F	H	CH	CH	C ₂₅ H ₂₉ FN ₄ O ₃	453,21	453,1
14-5		F	H	CH	CH	C ₂₂ H ₂₂ FN ₃ O ₃	396,15	396,1
14-6		H	H	CH	N	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₃	379,15	379,1
14-7		Cl	H	CH	N	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ O ₃	413,11	413,0
14-8		F	H	CH	N	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₃	397,14	397,1
14-9		F	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₁ FN ₄ O ₃	397,14	397,1
14-10		Cl	H	CH	N	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₅ O ₃	470,17	470,1
14-11		F	H	CH	N	C ₂₄ H ₂₈ FN ₅ O ₃	454,20	454,1

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

14-12		H	H	N	N	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₃	380,15	380,2
-------	---	---	---	---	---	---	--------	-------

Tabla 15

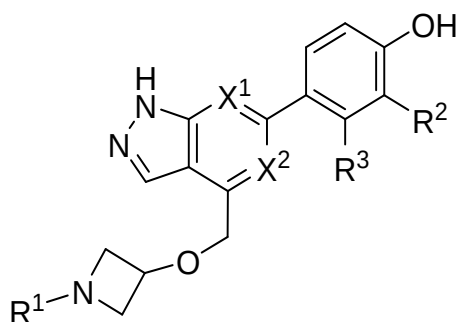


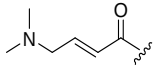
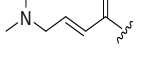
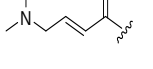
Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
15-1		Cl	H	CH	CH	C ₂₂ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	410,10	409,9
15-2		F	H	CH	CH	C ₂₂ H ₂₀ FN ₃ O ₃	394,13	393,4
15-3		H	H	N	N	C ₂₀ H ₁₉ N ₅ O ₃	378,13	378,1
15-4		Cl	H	CH	CH	C ₂₅ H ₂₇ ClN ₄ O ₃	467,16	467,1
15-5		F	H	CH	CH	C ₂₅ H ₂₇ FN ₄ O ₃	451,19	451,1
15-6		H	H	CH	N	C ₂₄ H ₂₇ N ₅ O ₃	434,20	434,1
15-7		H	H	CH	N	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₃	377,14	377,2
15-8		H	H	N	CH	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₃	377,14	377,0
15-9		Cl	H	N	N	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₅ O ₃	412,09	412,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

15-10		F	H	N	N	C ₂₀ H ₁₈ FN ₅ O ₃	396,12	396,1
-------	---	---	---	---	---	--	--------	-------

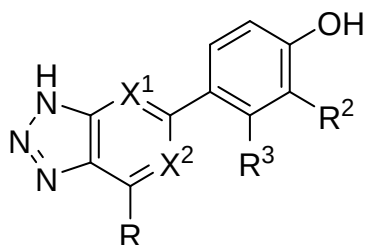
Tabla 16



Ex N.º	R ¹	R ₂	R ₃	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
16-1		Cl	H	C H	CH	C ₂₃ H ₂₅ ClN ₄ O ₃	441,15	441,2
16-2		Cl	H	C H	CH	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	384,09	384,1
16-3		F	H	C H	CH	C ₂₀ H ₁₈ FN ₃ O ₃	368,12	368,2
16-4		H	H	N	CH	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,0
16-5		H	H	C H	N	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,0
16-6		H	H	C H	N	C ₂₂ H ₂₅ N ₅ O ₃	408,18	408,1
16-7		F	H	C H	CH	C ₂₃ H ₂₅ FN ₄ O ₃	425,18	425,2

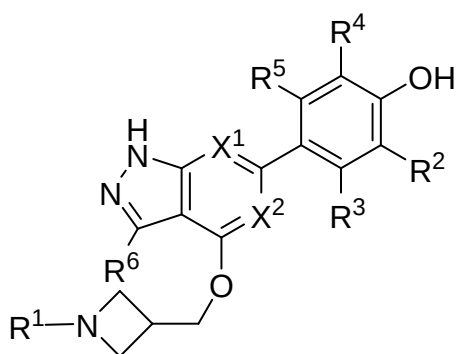
P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Tabla 17



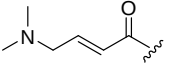
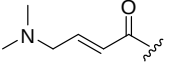
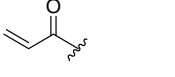
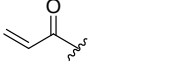
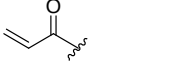
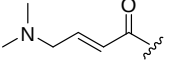
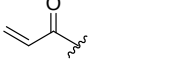
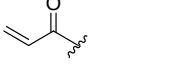
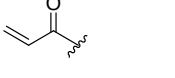
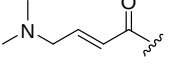
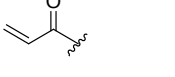
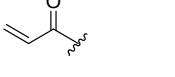
Ex N.º	R	R ¹	R ₂	R ₃	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
17-1			H	H	CH	CH	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,0
17-2			H	H	CH	CH	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃	351,12	351,2

Tabla 18



Ex N.º	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	X ¹	X ²	Fórmula	Calc [M+H] ⁺	Hallado [M+H] ⁺
18-1		Cl	H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₄ H ₂₇ ClN ₄ O ₃	455,16	455,0
18-2		H	F	H	F	H	CH	CH	C ₂₃ H ₂₄ F ₂ N ₄ O ₃	443,17	443,2

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

18-3		F	H	H	F	H	CH	CH	C ₂₃ H ₂₄ F ₂ N ₄ O ₃	443,17	443,0
18-4		H	H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃	421,2	421,0
18-5		H	H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364
18-6		Cl	H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	398,10	398,0
18-7		F	H	H	H	Me	CH	CH	C ₂₁ H ₂₀ FN ₃ O ₃	382,13	382,0
18-8		Me	H	H	H	H	CH	CH	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃	421,2	421,0
18-9		Me	H	H	H	H	CH	CH	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃	364,14	364,0
18-10		H	H	H	H	SMe	CH	CH	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	396,11	396,0
18-11		H	H	H	H	NMe ₂	CH	CH	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₃	393,17	393,0
18-12		H	H	H	H	CF ₃	CH	CH	C ₂₄ H ₂₅ F ₃ N ₄ O ₃	475,17	475,0
18-13		H	H	H	H	CF ₃	CH	CH	C ₂₁ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	418,11	418,0
18-14		H	H	H	H	Cl	CH	CH	C ₂₀ H ₁₈ ClN ₃ O ₃	384,09	384,2

Ensayos Biológicos

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

Ensayo 1: Ensayos Bioquímicos de JAK y Tyk2 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.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Los compuestos diluidos en serie o discretamente 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 Km 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 Tecnologías). 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 basados en 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 pKi (logaritmo negativo de constante de disociación, K_i) utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Ensayo 2: Ensayo de Potencia de JAK3 Celular: 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 linfocitos T humanos Tall-1 (DSMZ) usando AlphaLisa. Debido a que IL-2 señala a través de JAK3, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK3.

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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 (TA). 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 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 linfocitos T humanos. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir del análisis de las curvas de inhibición de la intensidad de

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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).

Ensayo 3: Inhibición de pSTAT5 estimulado por IL-2 en células T CD4+ aisladas de esplenocitos murinos

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por interleucina-2 (IL-2) se midió en las células T CD4+ aisladas de esplenocitos murinos usando AlphaLisa. Debido a que IL-2 señala a través de JAK3, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK3 en ratones.

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

Las células T CD4 + se aislaron de esplenocitos murinos mediante la selección negativa en una columna magnética (Miltenyi Biotec) y se volvieron a suspender en medios de ensayo (DMEM libre de rojo de fenol (Life Technologies) complementado con FBS al 10% (ATCC)). Las células se sembraron a 50.000 células/pocillo en medios de ensayo (2 μ L/pocillo). Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y se diluyeron hasta una concentración final 2x en medios de ensayo. Se agregó el compuesto (4 μ L/pocillo) y las células se incubaron a 37 °C, de CO₂ al 5% durante 1 hora, y luego se agregó IL-2 (R&D Systems; concentración final de 7 ng/mL) en medios de ensayo precalentados (2 μ L) durante 30 minutos. Después de la estimulación con citocinas, las células se lisaron con 2 μ L de 5x de tampón de lisis AlphaLisa (PerkinElmer). El lisado se agitó a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). El STAT5 fosforilado se midió con el kit pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). La mezcla de perlas aceptoras recién preparada se dispensó sobre lisado (5 μ L) 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 μ L) 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

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

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 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 primaria de células T CD4⁺ aisladas de esplenocitos murinos. 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).

Los compuestos 1-10, 19, 20, 21 y 22 tuvieron todos valores de pIC_{50} superiores a 6,0 en este ensayo.

Ensayo 4: Inhibición de pSTAT5 estimulada por IL-2 en células T CD4⁺ de PBMC humanas

La potencia de los compuestos de prueba para la inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por interleucina-2 (IL-2) se midió en las células T CD4⁺ de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante citometría de flujo. Debido a que IL-2 señala a través de JAK3, este ensayo proporciona una medida de la potencia celular de JAK3 en células primarias humanas.

La STAT5 fosforilada se midió mediante citometría de flujo midiendo la respuesta de pSTAT5 en células T CD4⁺ (Becton Dickinson, AlexaFluor 647 STAT5 anticuerpo dirigido contra IgG humana de ratón (pY694) y CD4 anti-humano de ratón PE).

Las PBMC humanas se aislaron de los donantes con gradiente de Ficoll y se congelaron a -80 °C. Las PBMC congeladas se descongelaron y se cultivaron durante una hora a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en rpml (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 1X Pen/Strep (Life Technologies). Las

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

células se sembraron en placas de pocillos profundos de 2 mL a 4×10^6 células/mL (50 μ L/pocillo). Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO y se diluyeron hasta una concentración final 2x en medios de ensayo. Se agregó el compuesto (100 μ L/pocillo) y las células se incubaron a 37 °C, de CO₂ al 5% durante 1 hora, y luego se agregó IL-2 (R&D Systems; concentración final de ensayo de 100 ng/mL) en medios de ensayo precalentados (50 μ L/pocillo) durante 30 minutos. Después de la estimulación con citocinas, las células se fijaron durante 10 minutos a 37 °C (Becton Dickinson). Las células se lavaron y se volvieron a suspender en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Life Technologies). Las células se permeabilizaron durante 30 minutos con Perm Buffer III helado (Becton Dickinson), y luego se lavaron y se volvieron a suspender con DPBS que contenía suero bovino fetal al 2% (tampón de tinción, Life Technologies). Las células se tiñeron durante 1 hora con una dilución de 50 veces de marcador de superficie CD4 (CD4 anti-humano de ratón PE) y una dilución de 5 de anticuerpo dirigido contra IgG humana pSTAT5 (Becton Dickinson, AlexaFluor 647, STAT5 anti-humano de ratón (pY694)) en tampón de tinción. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en tampón de tinción antes del almacenamiento a 4 °C.

Para determinar la potencia inhibitoria de los compuestos de prueba en respuesta a IL-2, se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia de pSTAT5 en células cerradas CD4⁺ en PBMC humanas con un BD LSRII con análisis en FCS Express 6. Los valores de CI₅₀ 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 pIC₅₀ (logaritmo decádico negativo IC₅₀) (media $\pm$ desviación típica).

Los compuestos 1-6, 8 y 9 se probaron en este ensayo y presentaron valores muy similares a los obtenidos en el ensayo 2 (pSTAT5 estimulado con IL-2 en el ensayo de células T Tall-1).

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

Ensayo 5: Ensayo de Citotoxicidad de JAK

Se realizó un ensayo luminiscente de viabilidad/citotoxicidad celular CellTiter-Glo en células epiteliales de pulmón humano (ATCC) BEAS-2B en condiciones normales de crecimiento.

Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5% en medio de DMEM al 50%/F-12 al 50% (Life Technologies) complementado con FBS al 10% (Hyclone), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies), y 2 mM GlutaMAX (Life Technologies). En el día 1 del ensayo, las células se sembraron a una densidad de 500 células/pocillo en placas de cultivo tisular blanco de 384 pocillos (Corning) con 25 µL de medio, y se las dejó adherirse durante la noche en la incubadora. En el día 2 del ensayo, se agregaron 5 µL de medio que contenía respuestas a la dosis de los compuestos de prueba, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, se agregaron 30 µL de solución de detección CellTiter-Glo (Promega), se mezclaron en un agitador orbital durante 5 minutos, y se incubaron durante 10 minutos adicionales antes de leerse en el lector EnVision. Se registraron las señales de luminiscencia y se calcularon los valores de control de porcentaje de DMSO.

Para el análisis de respuesta a la dosis, se representaron los datos de control de porcentaje de DMSO frente a las concentraciones de compuestos para obtener las curvas de respuesta a la dosis por línea que conecta cada punto de datos. La concentración a la que cada curva cruza el umbral de inhibición del 15% se define como CC₁₅. Los resultados se expresaron como el logaritmo negativo del valor de CC₁₅, pCC₁₅.

Se prevé que los compuestos de prueba que presentan un valor de pCC₁₅ más bajo en este ensayo tengan menos probabilidad de causar citotoxicidad. Los compuestos de la divulgación probados en este ensayo generalmente presentaron valores de pCC₁₅ entre 5 y aproximadamente 6.

Ensayo 6: Ensayo de Permeación de Caco-2

El ensayo de permeación de Caco-2 se realizó para representar la capacidad de los compuestos de prueba de pasar a través del intestino hacia el

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

torrente sanguíneo después de la administración oral. Se determinó la velocidad a la que los compuestos de prueba en solución penetran una monocapa celular diseñada para imitar la unión estrecha de monocapas del intestino delgado humano.

Se obtuvieron placas Transwell de 24 pocillos CacoReady de ADMEcell (Alameda, CA). Los compuestos se evaluaron a una concentración de 5 μM a partir de soluciones madre de DMSO de 10 mM por duplicado ($n=2$). La permeabilidad pasiva de los compuestos probados se evaluó utilizando monocapas de células Caco-2 junto con verapamilo (25 μM) para inhibir las proteínas de transporte de P-gp en la dirección apical a basolateral (A-B). El experimento se realizó en una incubadora con CO_2 al 5% a 37 °C. Los medios de cultivo de Caco-2 consistieron en DMEM filtrado estándar, FCS al 10%, L-glutamina al 1% y PenStrep al 1%. La placa de ensayo basal se preparó agregando 750 μL de tampón de transporte a los pocillos A-B. Se preparó una placa CacoReady™ retirando los medios de Caco-2 de los pocillos apicales y reemplazándolos con medios de transporte frescos (200 μL repetidos para un total de 3 lavados). Los medios en blanco (200 μL) se reemplazaron luego con compuesto diluido para los pocillos A-B. Para comenzar la incubación, se retiró la placa basal de la incubadora y se agregó la sección apical encima. Se recogieron muestras (40 μL) de los compartimientos apical y basal en el tiempo cero (t_0). Las muestras se recogieron nuevamente después de 120 minutos (t_{120}) de los compartimientos apical y basal. Todas las muestras se diluyeron y prepararon para bioanálisis mediante LC-MS/MS. El coeficiente de permeación (K_p , media A a B + P_{aparente} de verapamilo) en cm/s se calculó como dQ (flujo)/(dt x Área x concentración).

En este ensayo, un valor de K_p inferior a aproximadamente 5×10^{-6} cm/seg se considera favorable para minimizar la exposición sistémica y dirigirse al colon. Un valor de K_p inferior a aproximadamente 10×10^{-6} cm/seg también puede ser suficiente para minimizar la exposición sistémica y dirigirse al colon. En comparación, PF-06651600, un inhibidor de JAK3 disponible por vía sistémica

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

(2-propen-1-ona, 1-[(2*S*,5*R*)-2-metilo-5-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ilamino)-1-piperidinil]) presentó un valor de K_p de 25.

Resultados del Ensayo *In Vitro*

Todos los compuestos de los Ejemplos 1 a 18 y las Tablas 1 a 18 se evaluaron en uno o más de los ensayos descritos anteriormente.

En la Tabla 19 a continuación, para los ensayos de enzimas JAK1, JAK 2, JAK3 y TYK2, A representa un valor de pK_i ≥ 10 (K_i ≤ 0,1 nM), B representa un valor de pK_i entre 9 y 10 (K_i entre 1 nM y 0,1 nM), C representa un valor de pK_i entre 8 y 9 (K_i entre 10 nM y 1 nM), D representa un valor de pK_i entre 7 y 8 (K_i entre 100 nM y 10 nM), y E representa un valor de pK_i de 7 o inferior (K_i de 100 nM o superior). Para el ensayo de potencia de Tall-1, A representa un valor de pIC₅₀ ≥ 7,5 (IC₅₀ ≤ 32 nM), B representa un valor de pIC₅₀ entre 6,7 (inclusive) y 7,5 (IC₅₀ entre 200 nM y 32 nM), y C representa un valor de pIC₅₀ entre 6 y 6,7 (IC₅₀ entre 1 μM y 200 nM). Para los valores de JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi), A representa un valor de 3 o superior, B representa un valor de 2,3 a 3 y C representa un valor de 1,8 a 2,3. Para el ensayo de Caco, A representa un valor inferior a 5 x 10⁻⁶ cm/seg, B representa un valor entre 5 x 10⁻⁶ y 10 x 10⁻⁶ cm/seg, C representa un valor entre 10 x 10⁻⁶ y 22 x 10⁻⁶ cm/seg.

Tabla 19

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
1	E	D	A	E	B	A	A
2	E	E	A	E	A	A	A
3	E	E	B	E	B	A	A
4	E	E	A	E	B	A	A
5	E	D	A	E	B	A	A
6	E	D	A	E	A	A	A
7	E	D	B	E	B	A	B

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
8	E	D	A	E	A	A	A
9	E		B		B	A	A
10	E	E	A	E	B	A	A
11	E	E	B	E	B	A	A
12	E	E	B	E	B	B	A
13	E	E	A	E	B	A	A
14	E	E	B	E	B	A	C
15	E		B		C	A	A
16	E		B		B	A	A
17	E		B		C	B	
18	E	D	B	E	A	A	C
19	E	E	A	E	B	A	A
20	E	E	A	E	A	A	A
21	E	E	A	E	B	A	B
22	E	E	A	E	B	A	A
23	E	D	A	E	B	A	A
24	E	E	B	E	A	A	A
1-1	E	D	B	E		A	
1-2	E	D	A	E	A	A	C
1-3	E		B		B	A	
1-4	E		B		C	A	
1-5	E	D	A	E	A	A	B
1-6	E		B		C	A	
1-7	E		B		C	B	
1-8	E	E	B	E	B	A	B
1-9	E		A		C	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
1-10	E		B		C	A	
1-11	E	E	A	E	A	A	C
1-12	E		B		B	A	
1-13	E		B		B	B	A
1-14	E		A		B	A	A
1-15	E	E	A	E	B	A	A
1-16	E	D	B	E	B	B	A
1-17	E	D	B	E	A	A	A
1-18	D	D	B	E	A	B	A
1-19	E	D	B	E	B	A	A
1-20	E	D	B	E	A	B	A
1-21	E	E	B	E	B	A	A
1-22	E	D	A	E	B	A	A
1-23	D		B		A	B	A
1-24	E	E	B	E	C	A	C
1-25	E		B		B	A	C
1-26	E	E	A	E	B	A	B
1-27	E	D	A	E	B	A	
1-28	E		B		C	B	
1-29	D	D	B	E	B	B	
1-30	D		A		B	B	
1-31	E	E	A	E	B	A	
1-32	E		B		C	A	
1-33	E	E	B	E	B	A	
1-34	E	D	B	E	A	A	
1-35	D		A		A	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
1-36	D	D	B	E	A	B	
1-37	E		B		C	A	
1-38	E	E	A	E	B	A	
1-39	E		B		B	A	B
1-40	E	E	B	E	B	B	
1-41	E	E	B	E	B	A	
1-42	E		B		C	A	B
1-43	E		A		A	A	
1-44	E	E	A	E	A	A	C
1-45	E	E	A	E	A	A	
1-46	E	E	B	E	C	A	
1-47	E	E	B	E	B	B	C
1-48	E		C		B	B	
2-1	D		A		C	B	
2-2	E	D	B	E	B	A	A
2-3	E	D	B	E	B	A	B
2-4	E		B		C	B	
2-5	E	D	B	E	B	A	B
2-6	E		A		C	A	C
2-7	E		B		B	A	A
2-8	E	D	B	E	B	A	A
2-9	E		B		B	B	A
2-10	E	D	B	E	A	A	A
2-11	E	E	B	E	B	A	B
2-12	E		A		C	A	C
2-13	E		B		C	B	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
2-14	E		A		A	A	
2-15	E	E	A	E	B	A	C
2-16	E		B		C	A	
2-17	E	E	A	E	B	A	
3-1	E	E	B	E	A	A	A
3-2	E	E	B	E	B	A	A
3-3	E	E	B	E	A	A	B
3-4	E	D	B	E	A	A	B
3-5	D	D	B	E	A	B	A
3-6	D		A		A	A	
3-7	E	D	A	E	B	A	A
3-8	E	E	B	E	A	A	A
3-9	E		B		B	B	A
3-10	E		B		A	A	A
3-11	E	D	A	E	B	A	A
3-12	E		B		B	B	A
3-13	E	D	B	E	A	A	A
3-14	E		B		B	A	
3-15	E	E	A	E	B	A	A
3-16	E		A		B	A	A
3-17	E	D	A	E	A	A	A
3-18	E		A		B	A	A
3-19	E	E	B	E	B	A	A
3-20	E	D	B	E	B	B	A
3-21	E	E	B	E	A	A	A
3-22	E	E	A	E	B	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
3-23	E	D	A	E	B	A	A
3-24	E	E	B	E	B	A	A
3-25	E		C		B	B	A
3-26	E		B		B	A	A
3-27	E	E	A	E	B	A	A
3-28	E		A		A	A	B
3-29	E		B		A	A	A
3-30	E	D	A	E	B	A	A
3-31	E	E	A	E	B	A	B
3-32	E	E	B	E	A	A	A
3-33	E	E	B	E	B	B	A
3-34	E	E	A	E	B	A	A
3-35	E	E	B	E	A	A	A
3-36	E	E	A	E	B	A	A
3-37	E	D	A	E	A	A	A
3-38	E	E	A	E	B	A	A
3-39	E	E	A	E	B	A	A
3-40	B	D	A	E	A	A	A
3-41	B	C	B	E	A	B	A
3-42	B	D	B	E	A	B	A
3-43	E	D	B	E	A	A	A
3-44	D	D	B	E	A	B	A
3-45	E	E	B	E	A	A	A
3-46	E	E	A	E	A	A	A
3-47	E	D	B	E	A	B	A
3-48	D	D	A	E	A	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
3-49	E	D	B	E	A	B	A
3-50	E	E	B	E	B	A	A
3-51	E	E	B	E	C	A	A
3-52	E	E	B	E	B	A	A
3-53	E	E	B	E	B	A	A
3-54	E	E	B	E	A	A	A
3-55	E	E	A	E	B	A	A
3-56	E	D	A	E	A	A	A
3-57	E	E	A	E	B	A	A
3-58	E	E	A	E	B	A	A
3-59	E	D	B	E	A	B	A
3-60	E	E	A	E	B	A	
3-61	E	D	A	E	A	A	A
3-62	E	D	B	E	A	A	A
3-63	E	E	A	E	B	A	A
3-64	E	D	A	E	A	A	A
3-65	E	D	B	E	A	A	A
3-66	E	E	B	E	A	A	A
3-67	E	E	B	E	B	A	A
3-68	D	E	B	E	C	B	A
3-69	E	E	A	E	B	A	A
3-70	E	E	A	E	B	A	A
3-71	E	E	A	E	A	A	A
3-72	E	E	B	E	A	A	A
3-73	E	E	A	E	A	A	A
3-74	E	E	A	E	A	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
3-75	E	E	B	E	A	A	A
3-76	E		A		B	A	A
3-77	E	E	A	E	B	A	A
3-78	E	E	B	E	B	A	A
3-79	E	E	B	E	B	A	
3-80	E	E	A	E	B	A	A
3-81	E	E	A	E	A	A	A
3-82	D		A		A	B	A
3-83	E	E	A	E	A	A	B
3-84	E		A		B	A	
3-85	E	D	A	E	A	A	A
3-86	E	E	A	E	B	A	
3-87	E	E	B	E	B	A	
3-88	E	E	B	E	B	A	
3-89	E	E	A	E	B	A	
3-90	D		A		A	B	
3-91	D	D	A	E	A	A	
3-92	E	E	A	E	A	A	
3-93	E	E	A	E	A	A	
3-94	E	E	A	E	A	A	
3-95	E	E	A	E	A	A	
3-96	E	E	B	E	B	A	
3-97	E	E	B	E	A	B	
3-98	E	E	A	E	B	A	
3-99	E	E	A	E	A	A	
3-100	E	E	B	E	A	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
3-101	E	D	A	E	A	A	
3-102	E	E	B	E	B	A	
3-103	E	D	A	E	A	A	
3-104	E	E	A	E	A	A	
3-105	E	D	A	E	A	A	
3-106	E	E	B	E	B	A	
3-107	E	E	A	E	A	A	
3-108	E	D	A	E	A	A	
3-109	E	E	B	E	B	A	
3-110	E	E	B	E	B	A	
3-111	E	E	B	E	C	A	
3-112	E	E	B	E	B	A	A
3-113	E	D	A	E	A	A	A
3-114	E	E	B	E	A	A	
3-115	E	B	B	E	B	A	A
3-116	E	D	B	E	B	B	
3-117	E	D	B	E	B	B	
3-118	E	E	B	E	A	A	
3-119	E	D	A	E	B	B	A
3-120	E	D	A	E	B	A	A
3-121	E	D	B	E	B	A	A
3-122	E	D	A	E	A	A	
3-123	E		A		C	A	
3-124	E		B		B	A	
3-125	E	E	B	E	B	A	
3-126	E	D	A	E	C	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
3-127	E	D	A	E	B	A	
3-128	E	B	A	E	B	A	
3-129	E		B		C	A	A
3-130	E		B		B	A	A
3-131	E	B	B	E	A	B	
3-132	E	E	B	E	C	A	
3-133	E	D	A	E	C	A	
3-134	E		B		B	A	
4-1	E	E	B	E	B	A	A
4-2	D	D	B	E	B	B	A
4-3	E		B		B	B	A
4-4	E	E	A	E	B	A	A
4-5	E	E	B	E	A	A	A
4-6	E	E	B	E	B	A	A
4-7	E	E	C	E	B	B	A
4-8	E		B		B	B	
5-1	E		B		C	A	
5-2	E	E	B	E	B	A	A
5-3	E	E	A	E	A	A	A
5-4	E	E	B	E	A	A	A
5-5	E	D	A	E	B	A	A
5-6	E	E	B	E	B	A	A
5-7	E	D	A	E	B	A	A
5-8	E		B		C	A	
5-9	E		B		C	A	A
5-10	E		B		B	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
5-11	E		B		B	A	A
5-12	E	E	B	E	B	A	A
5-13	E		B		B	B	A
5-14	E	E	A	E	A	A	A
5-15	E		A		B	A	A
5-16	E	6	A	E	A	A	A
5-17	E	E	B	E	A	A	A
5-18	E	E	A	E	A	A	A
5-19	E	E	B	E	B	A	A
5-20	E		B		C	A	
5-21	E	E	B	E	A	A	
5-22	E	E	B	E	B	A	
5-23	E	E	B	E	B	A	
5-24	E		B		B	A	
5-25	E		B		A	A	
5-26	E		B		C	B	
6-1	D		A		B	B	
6-2	D	D	A	E	A	B	C
6-3	E	D	B	E	A	A	C
6-4	E	D	A	E	B	A	A
6-5	E		B		A	A	A
6-6	E	D	B	E	A	A	A
6-7	E		B		A	A	B
6-8	D		A		A	B	
6-9	E		B		B	A	A
6-10	E	D	B	E	A	A	C

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
6-11	E		A		B	A	B
6-12	E		B		B	A	A
6-13	E	D	B	E	A	B	A
6-14	D		A		A	B	B
6-15	E	D	B	E	B	A	B
6-16	E	D	B	E	B	A	A
6-17	E	E	A	E	B	A	A
6-18	E	E	A	E	B	A	B
6-19	D		B		B	B	
6-20	D	C	B	E	B	B	A
6-21	D	D	B	E	B	B	
6-22	E		B		C	A	
6-23	E		B		C	A	
7-1	E		B		C	A	
7-2	E	D	B	E	A	A	A
7-3	E	E	B	E	B	A	C
7-4	D	C	B	E	A	B	C
7-5	D		B		B	C	
7-6	D		A		A	B	
7-7	E	D	B	E	B	A	A
7-8	E	E	A	E	B	A	A
7-9	E	D	A	E	A	A	A
7-10	E	D	B	E	B	A	C
7-11	E	D	A	E	A	A	
7-12	E	D	B	E	B	A	
7-13	E	D	A	E	A	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
7-14	E	D	B	E	A	B	
8-1	E	D	B	E	A	B	C
8-2	E	D	B	E	B	A	A
8-3	E	D	B	E	A	A	A
8-4	E	D	B	E	B	B	A
8-5	E	D	A	E	A	A	A
8-6	E		B		B	A	B
8-7	E	D	B	E	B	A	B
8-8	E		A		B	A	B
8-9	E		B		C	B	
8-10	D		A		A	A	
8-11	D	D	A	E	A	B	
8-12	E		B		C	A	
8-13	E		B		C	A	
8-14	E	E	A	E	B	A	C
9-1	E	D	A	E	A	A	C
9-2	E	E	B	E	A	A	B
9-3	E		B		C	C	
9-4	E	C	A	E	A	A	C
9-5	D		B		C	C	
9-6	E		B		A	A	C
9-7	E		A		B	A	
9-8	D		B		C	C	
9-9	D	C	A	D	A	B	
9-10	E		B		A	A	C
9-11	E		A		B	A	C

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
10-1	D		A		B	B	A
10-2	D	C	A	D	A	B	C
10-3	D		B		B	B	
10-4	E	D	B	E	B	A	A
10-5	D		B		B	C	
10-6	D		B		A	B	
10-7	E	D	B	E	B	A	B
11-1	E		B		A	A	A
11-2	E		B		C	A	
12-1	E	D	B	E	B	A	
12-2	E		B		B	B	
12-3	D		B		C	B	
12-4	E	E	B	E	B	A	B
12-5	E		B		B	B	
12-6	D		B		B	B	
12-7	D		B		C	C	
12-8	E		B		C	A	A
12-9	E		B		C	A	A
12-10	E		C		B	B	
12-11	E		B		C	A	
12-12	E		B		B	A	
12-13	E		B		C	A	
12-14	E		B		C	C	
12-15	E		B		B	B	
12-16	D	C	B	E	A	B	
12-17	D	C	A	E	A	B	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
12-18	D		A		B	B	
12-19	E		A		C	A	
12-20	E	D	B	E	A	A	B
12-21	E		B		A	B	A
12-22	E		B		C	A	A
12-23	E		B		B	A	B
12-24	E		B		C	A	A
12-25	E		B		C	B	A
12-26	E	D	B	E	C	B	
12-27	E	D	A	E	A	A	C
12-28	E	C	A	E	B	A	C
12-29	E	D	B	E	A	A	C
12-30	E	C	A	E	A	A	C
12-31	E	C	A	E	B	A	C
12-32	E	D	A	E	A	A	C
12-33	E	E	B	E	B	A	A
12-34	E	E	B	E	A	B	A
12-35	E	E	B	E	B	B	A
12-36	D	E	A	E	A	A	A
12-37	D		B		B	B	A
12-38	E	E	A	E	B	A	A
12-39	E	E	B	E	A	A	B
12-40	E		B		C	B	A
12-41	E	E	B	E	A	A	A
12-42	E	D	B	E	B	B	A
12-43	E	D	A	E	A	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
12-44	E	D	A	E	B	A	A
12-45	E	E	A	E	C	A	A
12-46	E	D	A	E	B	A	A
12-47	E	E	B	E	B	A	A
12-48	E	E	B	E	A	A	A
12-49	E	E	B	E	C	A	
12-50	E	E	A	E	B	A	
12-51	D	D	A	E	B	A	
12-52	D		B		C	B	
12-53	E	C	B	E	A	B	
12-54	E	D	B	E	A	B	
12-55	E		A		B	A	
12-56	E		A		B	A	
12-57	E	D	B	E	B	A	
12-58	E	D	A	E	B	A	
12-59	E		A		B	A	
12-60	E	E	B	E	B	A	
12-61	E	E	A	E	B	A	
12-62	E		A		B	A	
12-63	E	E	B	E	B	A	
12-64	E	E	A	E	A	A	
12-65	E	E	B	E	C	A	
12-66	E	E	B	E	B	A	
12-67	E	E	B	E	B	A	
12-68	E	E	B	E	C	A	
12-69	E		A		B	A	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
13-1	E	E	B	E	B	A	A
13-2	E	E	B	E	A	A	A
13-3	E		A		A	A	A
13-4	E	D	A	E	B	A	
13-5	E	D	A	E	B	A	
13-6	E	E	A	E	A	A	
13-7	E	D	A	E	B	A	
13-8	E	E	B	E	A	A	
13-9	E	E	B	E	B	A	
13-10	E	E	B	E	B	A	
13-11	E	E	A	E	A	A	C
13-12	E	E	B	E	B	A	C
13-13	E	E	B	E	C	A	C
13-14	E	D	A	E	A	A	
13-15	E	D	B	E	B	A	
13-16	E	E	B	E	B	A	C
13-17	E		A		B	A	
13-18	E		B		B	A	
13-19	E	E	A	E	B	A	
13-20	E	E	B	E	B	B	
13-21	E	D	B	E	A	B	
13-22	E	E	B	E	B	A	
14-1	E	E	B	E	A	A	A
14-2	E	E	A	E	B	A	A
14-3	E		B		B	B	
14-4	D		B		B	B	

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
14-5	D		B		A	B	
14-6	D		A		A	B	
14-7	D		A		A	B	
14-8	D		A		A	B	
14-9	E	E	B	E	B	A	
14-10	D		B		C	C	
14-11	D		B		C	B	
14-12	E	E	B	E	C	A	
15-1	E	E	B	E	A	A	A
15-2	D	D	A	E	A	B	A
15-3	E	E	A	E	A	A	A
15-4	E		A		B	A	
15-5	D	D	B	E	B	B	
15-6	D		A		C	B	
15-7	E	D	B	E	A	B	
15-8	D		B		B	B	
15-9	E	E	A	E	B	A	
15-10	E	E	A	E	A	A	
16-1	E	E	A	E	B	A	A
16-2	E	E	A	E	A	A	A
16-3	E	E	B	E	A	A	A
16-4	E		B		B	A	A
16-5	E	E	A	E	A	A	A
16-6	E	E	B	E	C	A	
16-7	E	E	A	E	B	A	
17-1	E	E	B	E	B	A	A

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

Número de Ejemplo	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)	Tall-1 (pIC ₅₀)	JAK3 (pKi)-JAK1 (pKi)	Caco K _p 10 ⁻⁶ cm/seg
17-2	E		A		C	A	A
18-1	E	D	B	E	A	B	A
18-2	D		A		A	C	
18-3	D	D	A	E	A	B	
18-4	D		A		B	B	
18-5	D		B		A	B	
18-6	D		B		A	B	
18-7	D		B		A	C	
18-8	E	E	B	E	B	A	
18-9	E	E	A	E	A	A	
18-10	E	D	A	E	B	A	
18-11	E		B		C	A	
18-12	D	D	B	E	B	B	
18-13	E	D	A	E	A	A	
18-14	E		B		B	A	

Ensayo 7: Farmacocinética de colon y plasma de ratón

Se administró a 6 ratones Balb/c machos 10 mg/kg de compuesto en HPMC al 1% + Tween-80 al 0,1% mediante administración oral. A las 0,5, 2 y 6 horas después de la administración de la dosis, los animales se anestesiaron y se recogieron muestras de sangre terminal mediante punción cardíaca, seguida de la recolección de contenido de colon y tejido de colon.

Se recogieron muestras de sangre en K₂EDTA y se almacenaron en hielo húmedo hasta que se procesaron en plasma mediante centrifugado (12.000 rpm a 4 °C). Las muestras de plasma se transfirieron a series de tubos y se colocaron en hielo seco antes del almacenamiento en el congelador. El contenido de colon de cada animal se recolectó en cada punto temporal de recolección de sangre

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

terminal. Los tejidos del colon se enjuagaron con solución salina y se secaron. Los tejidos de colon y contenido de colon se homogeneizaron con agua estéril que contenía ácido fórmico al 0,1% 9:1 (agua:tejido, v/p). Los tejidos y el contenido de colon homogeneizados se transfirieron a series de tubos y se colocaron en hielo seco antes del almacenamiento en el congelador. Todas las muestras se analizaron mediante LC/MS/MS contra estándares analíticos.

Los parámetros farmacocinéticos compuestos de los compuestos se determinaron mediante análisis no compartimental utilizando Phoenix WinNonlin, Versión 6 (Certara, St. Louis, MO) y utilizando los valores medios de 2 animales/puntos temporales. Para concentraciones plasmáticas por debajo del límite de cuantificación (BQL), se usó la concentración más baja medible o BLOQ (por debajo del límite de cuantificación).

Se determinó una relación de colon a plasma como la relación del AUC de colon al AUC de plasma. Los compuestos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 21 y 22 presentaron una relación de colon a plasma superior a aproximadamente 1250. Los compuestos 9, 5, 19 y 20 exhibieron una relación entre colon y plasma superior a aproximadamente 200.

Por el contrario, el compuesto de referencia (PF-06651600, un inhibidor de JAK3 disponible por vía sistémica) 2-propen-1-ona, 1-[(2*S*,5*R*)-2-metilo-5-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ilamino)-1-piperidinil], presentó una relación a colon a plasma de 2,8.

Ensayo 8: Modelo de ratón de colitis inducida por oxazolona

La colitis inducida por oxazolona es un modelo experimental que tiene una semejanza histológica con la colitis ulcerosa humana (Heller et al. *Immunology*, **2002**, 17, 629-638). Se usaron ratones adultos BALB/C de Harlan en el ensayo. En el día 1, los animales se anestesiaron ligeramente con isoflurano y los pelos entre los hombros se eliminaron cuidadosamente antes de administrarles oxazolona (4%, 150 µL, formulación 4:1 de acetona:aceite de oliva) o se aplicó lentamente solución de vehículo para sensibilizar la piel. Siete días después de la sensibilización de la piel, los ratones ayunaron alrededor de 6 horas antes, se

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

anestesiaron con inyección de ketamina/xilazina y se insertó cuidadosamente una jeringa de 1 mL equipada con un catéter de 3,5 F, lleno con solución de oxazolona, aproximadamente 4 cm dentro del colon del ratón. Después de la inserción, se inyectaron muy lentamente en el colon 50 µL de la solución de oxazolona (0,8% en una formulación 1:1 de etanol: agua) (durante 30 segundos con una bomba de inyección). El tratamiento con medicamento (PO, QD o BID o TID) o el vehículo se inició un día antes de la exposición intrarrectal (IR) a oxazolona. Dos días después de la exposición intrarrectal a oxazolona, investigadores con enmascaramiento del tratamiento de cada ratón evaluaron la enfermedad de acuerdo con el puntaje de los criterios: puntaje de consistencia de las heces (0, normal; 2, blandas; 4, diarrea), puntaje de sangrado bruto (0, ausencia; 2, sangre teñida; 4, presencia); criterio de valoración del puntaje de heces combinado = puntaje de consistencia de heces + puntaje de sangre en heces.

Los compuestos seleccionados se evaluaron en el ensayo. La eficacia en el modelo se evidencia por una disminución de importancia estadística en el criterio de valoración del puntaje de heces combinado en comparación con el puntaje de los animales tratados con vehículo.

Los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 3-11, 5-10, 19, 15-1, 3-55, 3-34, 15-3, 21, 3-80, 3-81, 3-72 y 3-57 presentaron una disminución de importancia estadística en el criterio de valoración del puntaje de heces combinado en comparación con los animales tratados con vehículo en el modelo de oxazolona a una dosis de 3 mg/kg (PO, BID). Los compuestos 3-113 y 3-74 presentaron una disminución de importancia estadística en el criterio de valoración del puntaje de heces combinado en comparación con los animales tratados con vehículo en el modelo de oxazolona con dosis de 1 y 10 mg/kg solamente (PO, BID).

Ensayo 9: Efectos de inmunosupresión en linfocitos citolíticos naturales (NK) esplénicos de ratón

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

El agotamiento de las células esplénicas de ratón es un modelo experimental de inmunosupresión (Kudlacz et al., *Am. J. of Transplantation*, **2004**, 4, 51-57). Se evaluaron compuestos seleccionados en el modelo de células esplénicas de ratón siguiendo el mismo paradigma de tratamiento utilizado en el modelo de colitis inducida por oxazolona (ensayo 8).

Se usaron ratones adultos Balb/C machos de Harlan en el estudio. El compuesto de prueba y un inhibidor covalente Jak3 estándar 2-propen-1-ona, 1-[(2S,5R)-2-metilo-5-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-1-piperidinil] (30 mg/kg, BID) como control positivo, se administraron por vía oral durante tres días a ratones no tratados previamente. Los bazo se cosecharon hasta 4 horas después de la última dosis y se trituraron inmediatamente para la tinción del subtipo celular. Antes de la fijación, los anticuerpos marcados con fluoróforo para CD19 (FITC; células B), CD3e (PE; células T pan) y CD49e (APC; linfocitos NK) se incubaron con muestras de esplenocitos de cada animal para permitir el análisis simultáneo de múltiples subtipos en % en el citómetro de flujo. El número de células de bazo totales para cada animal se midió mediante el contador celular automático de mano Sceptre™ 2.0.

El número absoluto de la población de subtipos de linfocitos (por ejemplo, células B, T y NK esplénicas) se calculó a partir del porcentaje de cada subtipo multiplicado por las células de bazo totales para cada animal. Se utilizó un ANOVA unidireccional, con la prueba *post hoc* LSD de Fisher, para comparar el número de linfocitos esplénicos del vehículo y los grupos de compuestos de prueba. El nivel de α se estableció en $p < 0,05$. Los datos se presentaron como la media $\pm$ MEB para cada grupo.

El control positivo, PF-06651600, un inhibidor de JAK3 disponible por vía sistémica (2-propen-1-ona, 1-[(2S,5R)-2-metilo-5-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-1-piperidinil]) (30 mg/kg PO, BID), disminuyó significativamente los recuentos de linfocitos NK esplénicos. Los recuentos de linfocitos citolíticos naturales esplénicos no se vieron afectados por el compuesto 1 a dosis (PO, BID) de hasta 300 mg/kg (la dosis máxima evaluada). Los recuentos de linfocitos citolíticos naturales esplénicos no se vieron afectados por los compuestos 4, 6 y

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

8 a dosis (PO, BID) de hasta 100 mg/kg (la dosis máxima evaluada). Los recuentos de linfocitos citolíticos naturales esplénicos no se vieron afectados por el compuesto 3 a dosis (PO, BID) de hasta 85 mg/kg (la dosis máxima evaluada). Los recuentos de linfocitos citolíticos naturales esplénicos no se vieron afectados por el compuesto 2 a dosis (PO, BID) de hasta 30 mg/kg (la dosis máxima evaluada). Los recuentos de linfocitos citolíticos naturales esplénicos no se vieron afectados por el compuesto 5 a dosis (PO, BID) de hasta 80 mg/kg (la dosis máxima evaluada). No se observaron efectos del tratamiento para las poblaciones de linfocitos B y T con ninguno de los compuestos probados.

Ensayo 10: Ensayo de interacción sistémica diana: Modelo murino de inducción de pSTAT5 inducida por IL-2 en el timo

La IL-2 es una citocina importante que subyace en la fisiopatología de las enfermedades gastrointestinales, tales como la enfermedad del intestino irritable (EII; Guan y Zhang). *Mediators Inflamm*, 2017; 4810258). La IL-2 se une a los receptores de la superficie celular que activan a los miembros de la familia de cinasas de Jano (JAK), específicamente JAK3, que luego fosforilan a STAT5 y posteriormente activan otras vías de transcripción. En este modelo, se administró una dosis de IL-2 sistémicamente a ratones para inducir la fosforilación de STAT5 (pSTAT5) que luego se midió como criterio de valoración. Los compuestos probados en este ensayo que no presentan una inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 se compararon con los pacientes tratados con vehículo; los animales de control expuestos a IL-2 demuestran falta de actividad sistémica.

Se usaron ratones adultos Balb/C machos de Harlan en el ensayo. A los animales se les administró el compuesto de prueba por sonda nasogástrica (PO, 10 o 30 mg/kg para estudios de dosis única; 10- 60 mg/kg para estudios de respuesta a la dosis) en la tarde del día anterior al estudio y luego en la mañana del día de estudio. Dos horas después de la administración de la segunda dosis oral, los ratones recibieron la inyección por vía intraperitoneal (i.p.) con 100 µL de una dosis apropiada de IL-2 (para un total de 1 - 5 µg/ratón de acuerdo con

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

el lote de IL-2; R&D Systems). 90 a 120 minutos después del insulto a IL-2, se recogieron muestras de timo. Se determinaron los niveles de STAT5 (pSTAT5) fosforilado en el timo utilizando AlphaLISA (AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-STAT5 (Tyr694/699) HV (alto volumen). La actividad en el modelo se evidencia por la falta de inhibición significativa en el nivel de pSTAT5 presente en el timo de los animales tratados a las 1,5-2 horas después de la exposición a IL-2.

Los compuestos 6 y 7 se probaron a 10 mg/kg y no presentaron inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 en comparación con los pacientes tratados con vehículo; por lo tanto, los animales de control expuestos a IL-2 demuestran falta de actividad sistémica. El Compuesto 1 se analizó a 10, 30, 60 y 100 mg/kg y no presentó una inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 en comparación con el vehículo. El Compuesto 2 se analizó a 10, 30 y 60 mg/kg y no presentó una inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 en comparación con el vehículo. El Compuesto 3 se analizó a 30 y 100 mg/kg y no presentó una inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 en comparación con el vehículo. Los compuestos 8, 5 y 4 se analizaron a 30 mg/kg y no presentaron una inhibición significativa de pSTAT5 inducida por IL-2 en comparación con el vehículo.

Por el contrario, el compuesto de referencia (PF-06651600, un inhibidor de JAK3 disponible por vía sistémica) 2-propen-1-ona, 1-[(2*S*,5*R*)-2-metilo-5-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-ilamino)-1-piperidinil], presentó una inhibición significativa de inducción de pSTAT5 en el timo a 10, 30 y 50 mg/kg, lo que demuestra la actividad sistémica.

Estructuras Cristalinas

Se obtuvieron estructuras cocrystalinas para los compuestos 1, 3 y 4, cada uno unido al JAK3 humano. Las resoluciones para las estructuras complejas fueron de 2,73 Å, 2,80 Å y 2,64 Å, respectivamente, para el compuesto 1, el compuesto 3 y el compuesto 4. En cada caso, se observó que los ligandos se unían en el sitio de unión de ATP. Según una distancia de menos de 3,5 Å de los átomos donantes y aceptores, se identificaron cuatro enlaces de hidrógeno

P-2020/883
Descripción Modificada
25 de noviembre de 2020

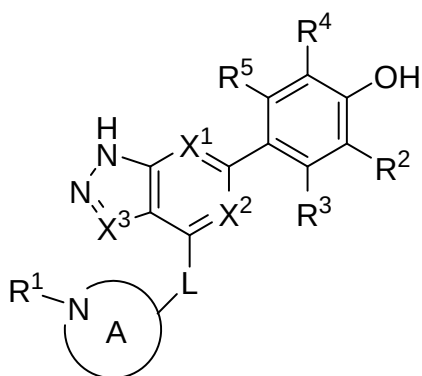
específicos para cada uno de los ligandos, a saber, los átomos de la cadena principal de Glu903, Leu905 y Phe968, así como también los átomos de la cadena lateral de Glu871. Se identificó un enlace de hidrógeno adicional para el compuesto 1 a los átomos de la cadena lateral de Asp 912. Cabe destacar que los ligandos están unidos de manera covalente a Cys909 de JAK3 ubicado poco después de la región de la bisagra. La fracción S-H del residuo de cisteína realiza una reacción de adición al sistema de Michael. Los resultados observados de la interacción de unión covalente en las estructuras cristalinas confirman la naturaleza de unión irreversible para cada uno de estos ligandos a JAK3.

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 este documento se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada documento se hubiera incorporado individualmente por referencia en este documento.

P-2020/883
 Descripción Modificada
 25 de noviembre de 2020

RESUMEN

La invención proporciona compuestos de la fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde las variables se definen en la especificación, que son inhibidores de quinasas JAK, particularmente JAK3. La invención también proporciona formas cristalinas, composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos, métodos para usar dichos compuestos para tratar enfermedades inflamatorias de tipo gastrointestinales y de otro tipo, y procesos y productos intermedios útiles para preparar tales compuestos.