

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 491**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10765557 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2486041**

54 Título: **Derivados de hidroxilo, ceto y glucurónido de 3-(4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo**

30 Prioridad:

**09.10.2009 US 250387 P**

**22.03.2010 US 316218 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**19.12.2013**

73 Titular/es:

**INCYTE CORPORATION (100.0%)**  
**Experimental Station, Route 141 & Henry Clay**  
**Road, Building E336/225**  
**Wilmington, DE 19880**

72 Inventor/es:

**RODGERS, JAMES, D.;**  
**SHILLING, ADAM;**  
**ARVANITIS, ARGYRIOS, G.;**  
**SHEPARD, STACEY;**  
**GALYA, LAURINE, G.;**  
**LI, MEI y**  
**NEDZA, FRANK, M.**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

ES 2 435 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados de hidroxilo, ceto y glucurónido de 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo

5

**Campo de la invención**

La presente invención proporciona derivados de hidroxilo, ceto y glucurónido de 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo.

10

**Antecedentes de la invención**

Las proteína cinasas (PK) son un grupo de enzimas que regulan procesos biológicos importantes, diversos incluyendo crecimiento, supervivencia y diferenciación celulares, formación y morfogénesis de órganos, neovascularización, reparación y regeneración de tejidos, entre otros. Las proteína cinasas ejercen sus funciones fisiológicas a través de la catalización de la fosforilación de proteínas (o sustratos) y modulando de ese modo las actividades celulares de los sustratos en diversos contextos biológicos. Además de las funciones en tejidos/órganos normales, muchas proteína cinasas también desempeñan papeles más especializados en un huésped de enfermedades humanas incluyendo cáncer. Un subconjunto de proteína cinasas (también denominadas proteína cinasas oncogénicas), cuando se desregulan, pueden provocar formación y crecimiento tumoral, y contribuir además al mantenimiento y la progresión tumorales (Blume-Jensen P *et al*, Nature 2001, 411(6835):355-365). Hasta la fecha, las proteína cinasas oncogénicas representan uno de los grupos más grandes y más atractivos de dianas proteicas para la intervención del cáncer y el desarrollo de fármacos.

15

20

25

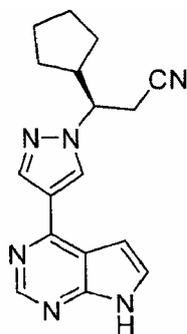
30

La familia de la cinasa Janus (JAK) desempeña un papel en la regulación dependiente de citocinas de la proliferación y función de células implicadas en la respuesta inmunitaria. Actualmente, existen cuatro miembros conocidos de la familia JAK de mamíferos: JAK1 (también denominada cinasa Janus-1), JAK2 (también denominada cinasa Janus-2), JAK3 (también denominada cinasa Janus, leucocitaria; JAKL; L-JAK y cinasa Janus-3) y TYK2 (también denominada proteína-tirosina cinasa 2). Las proteínas JAK oscilan en tamaño entre 120 y 140 kDa y comprenden siete dominios de homología de JAK (JH) conservados; uno de estos es un dominio cinasa catalítico funcional, y otro es un dominio pseudocinasa que tiene posiblemente una función reguladora y/o sirve como sitio de acoplamiento para las STAT (Scott, Godshall *et al*. 2002, citado anteriormente).

35

40

El bloqueo de la transducción de señales al nivel de las cinasas JAK es prometedor para desarrollar tratamientos para cánceres humanos. También se prevé que la inhibición de las cinasas JAK tiene beneficios terapéuticos en pacientes que padecen trastornos inmunitarios de la piel tales como psoriasis y sensibilización de la piel. Por consiguiente, se buscan ampliamente inhibidores de cinasas Janus o cinasas relacionadas y varias publicaciones notifican clases eficaces de compuestos. Por ejemplo, se notifican determinados inhibidores de JAK, incluyendo (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo mostrado a continuación, en el documento U.S. con número de serie 11/637.545 (documento US 2007/0135461), presentado el 12 de diciembre de 2006; el documento U.S. con número de serie 12/138.082 (documento US 2009/0181959), presentado el 16 de julio de 2009; y se notifican determinados metabolitos del compuesto I en el documento U.S. con número de serie 12/137.883 (documento US 2008/0312258), presentado el 12 de junio de 2008.



45

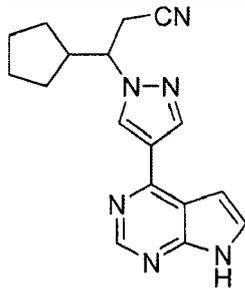
**I**

Por tanto, se necesitan continuamente agentes nuevos o mejorados que inhiban cinasas tales como cinasas Janus para desarrollar productos farmacéuticos nuevos y más eficaces para tratar el cáncer y otras enfermedades. Los metabolitos, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento están dirigidos hacia estas necesidades y otros fines.

50

**Sumario de la invención**

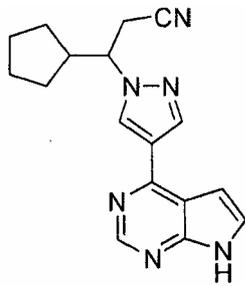
La presente invención proporciona, entre otros, derivados de hidroxilo, ceto y glucurónico de un compuesto de fórmula I:



**I**

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por tanto, en un aspecto, se proporciona en el presente documento un compuesto de fórmula I:



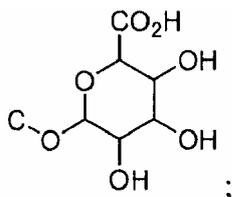
**I**

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

15 n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH; o,

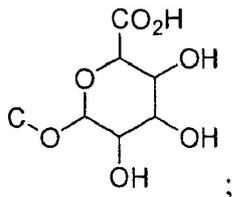
un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O; o,

un grupo C-H está sustituido con:



20 ;  
o,

25 dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:



y  
30 n es 1, 2, 3 ó 4;

siempre que el compuesto no se seleccione de:

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

5

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-oxociclopentil)propanonitrilo;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 En una realización de fórmula I,

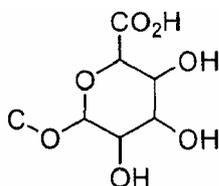
el átomo de carbono alfa con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH o C=O; y

el átomo de carbono beta con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH.

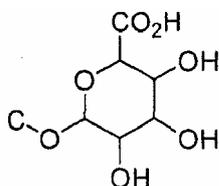
15

En otra realización del compuesto, n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH. En otra realización, n es 1. Aún en otra realización, n es 2. Todavía en otra realización, n es 3. En otra realización, n es 4. En otra realización de fórmula I, un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O. Todavía en otra realización, un grupo C-H está sustituido con

20

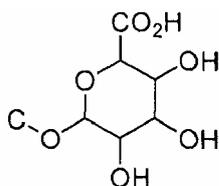


En otra realización, un grupo C-H saturado está sustituido con



25

Aún en otra realización, dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:



30

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden compuestos descritos en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

35

La presente invención proporciona además métodos de modulación de una actividad de JAK que comprenden poner en contacto JAK con determinados compuestos descritos en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La presente invención proporciona además métodos de tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de determinados compuestos descritos en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización particular, la enfermedad está asociada con actividad de JAK. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra huésped. La enfermedad también puede ser una enfermedad autoinmunitaria, incluyendo, pero sin limitarse a, un trastorno de la piel, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, diabetes tipo I, lupus, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulinas, miocarditis o trastorno de tiroides autoinmunitario. La enfermedad autoinmunitaria también puede ser un trastorno cutáneo ampolloso, por ejemplo, pénfigo vulgar (PV) o pénfigoide ampolloso (PA). El trastorno cutáneo puede ser dermatitis atópica, psoriasis, sensibilización de la piel, irritación de la piel, exantema cutáneo, dermatitis de contacto o sensibilización por contacto alérgica.

45

En otra realización, la enfermedad es una enfermedad viral. Los ejemplos de enfermedades virales que pueden tratarse mediante los compuestos descritos en el presente documento incluyen virus de Epstein Barr (VEB), hepatitis B, hepatitis C, VIH, VLTH 1, virus de la varicela zóster (VVZ) o virus del papiloma humano (VPH).

En otra realización, la enfermedad es cáncer, por ejemplo, un tumor sólido. El cáncer que va a tratarse puede ser cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman o cáncer pancreático. En una realización particular, el cáncer es cáncer de próstata. El cáncer puede ser hematológico. El cáncer también puede ser un linfoma, una leucemia o un mieloma múltiple. En otra realización, el cáncer es un cáncer de piel, por ejemplo, linfoma de células T cutáneo o linfoma de células B cutáneo. En otra realización, el cáncer es mieloma múltiple. La enfermedad que va a tratarse también puede ser fatiga que resulta de o está asociada con cáncer, o anorexia o caquexia que resulta de o está asociada con cáncer.

En otra realización, la enfermedad que va a tratarse es un trastorno mieloproliferativo, por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE) o enfermedad de mastocitosis sistémica (SMCD).

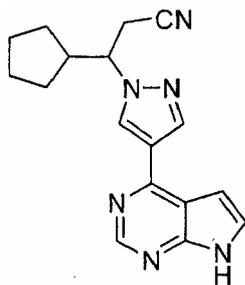
En otra realización, la enfermedad que va a tratarse es una enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria del ojo, por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis o conjuntivitis. La enfermedad inflamatoria puede ser una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, por ejemplo, las vías respiratorias superiores o las vías respiratorias inferiores. La enfermedad inflamatoria puede ser una miopatía o miocarditis inflamatoria.

En otra realización, la enfermedad es isquemia por reperfusión o está relacionada con un acontecimiento isquémico.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona, entre otros, derivados de hidroxilo, ceto y glucurónido de 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo. En algunas realizaciones, el compuesto es un metabolito del compuesto I. En algunas realizaciones, el compuesto es un metabolito activo que puede modular la actividad de una o más JAK y puede ser útil, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión o actividad de JAK. En algunas realizaciones, se mide el nivel de un compuesto de metabolito descrito en el presente documento y se obtiene su perfil con el fin de ayudar a un médico en el ajuste de los niveles de dosificación del compuesto de fórmula I.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



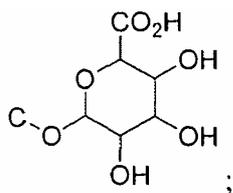
**I**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH; o,

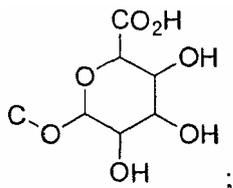
un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O; o,

un grupo C-H está sustituido con:



o,

5 dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:



y

10 n es 1, 2, 3 ó 4;

siempre que el compuesto no se seleccione de:

15 3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

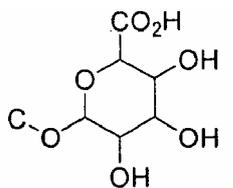
20 3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-oxociclopentil)propanonitrilo;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

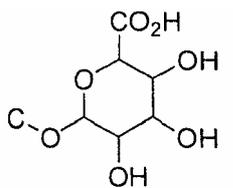
En algunas realizaciones, n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4.

En algunas realizaciones, un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O.

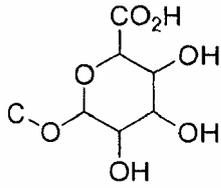
En algunas realizaciones, un grupo C-H está sustituido con



En algunas realizaciones, un grupo C-H saturado está sustituido con

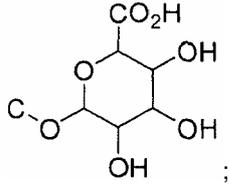


35 En algunas realizaciones, dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:

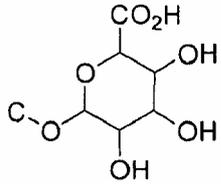


En algunas realizaciones:

- 5 el átomo de carbono alfa con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH, C=O, o



- 10 y el átomo de carbono beta con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH o

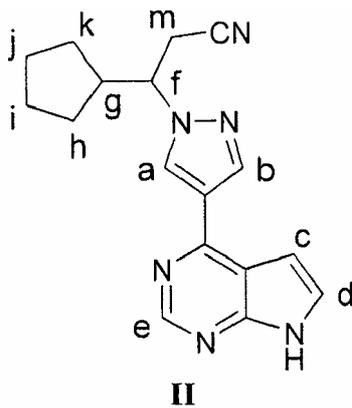


En algunas realizaciones:

- 15 el átomo de carbono alfa con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH o C=O; y  
el átomo de carbono beta con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH.

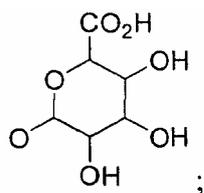
En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II:

20



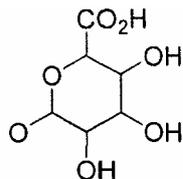
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 25 1, 2, 3 ó 4 de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH; o,  
uno de los carbonos h, i, j, k, o m está sustituido independientemente con =O; o,  
30 uno de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m está sustituido con:



o,

- 5 dos de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH y:



siempre que el compuesto no se seleccione de:

10

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

15

3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-oxociclopentil)propanonitrilo;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

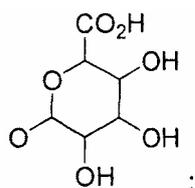
20

En algunas realizaciones de fórmula II, 1, 2, 3 ó 4 de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH. En algunas realizaciones, uno de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m está sustituido con OH. En algunas realizaciones, 2 de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH. En algunas realizaciones, 3 de de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH. En algunas realizaciones, 4 de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH.

25

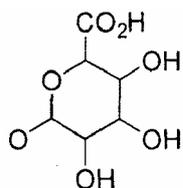
En algunas realizaciones, uno de los carbonos h, i, j, k, o m está sustituido con =O.

En algunas realizaciones, uno de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m está sustituido con:



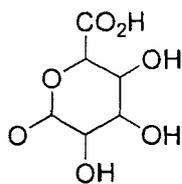
30

En algunas realizaciones, uno de los carbonos f, g, h, i, j, k o m está sustituido con:



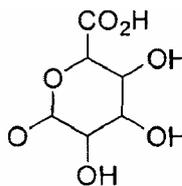
35

En algunas realizaciones, dos de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m están sustituidos cada uno independientemente con OH y uno de los carbonos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k o m está sustituido con:



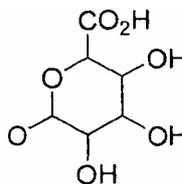
En algunas realizaciones:

- 5 El carbono m no está sustituido con un grupo OH, =O, o



y el carbono f no está sustituido con un grupo OH o

10



En algunas realizaciones:

- 15 el carbono m no está sustituido con un grupo OH o =O; y  
el carbono f no está sustituido con un grupo OH.

20 Se supone que cada una de las realizaciones mencionadas anteriormente se adhiere a las reglas para valencia apropiada.

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de:

25 ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1,2-dihidroxiciclopentil)propanonitrilo; y

30 3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de:

35 3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentil-3-hidroxipropanonitrilo;

40 3-(4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentil-2-hidroxipropanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(5-hidroxi-4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(3-hidroxi-4-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

45 3-ciclopentil-3-(4-(5-hidroxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(4-(6-hidroxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(4-(2-hidroxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1,2-dihidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(4-(5,6-dihidroxi-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo; y

5 ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

10 En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden incluir los compuestos mostrados en los diagramas 1-7 a continuación, y enantiómeros, diastereómeros y racematos de los mismos.

15 Diagrama 1

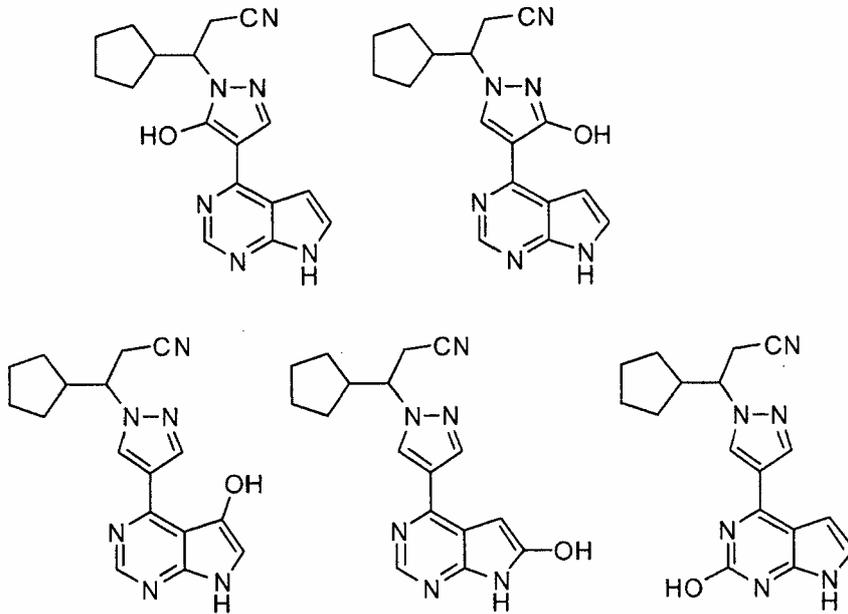


Diagrama 2

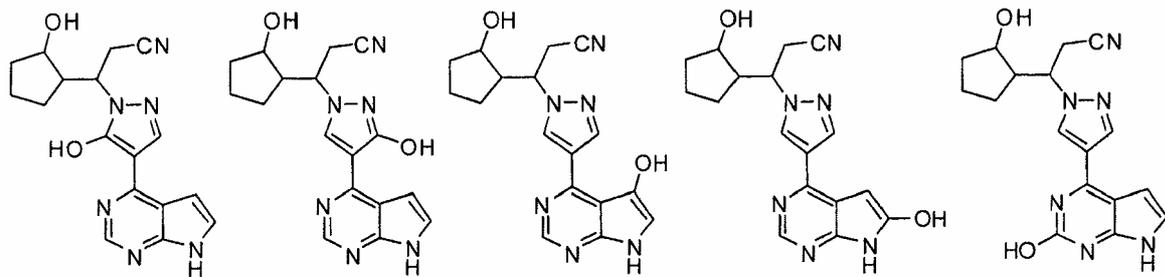
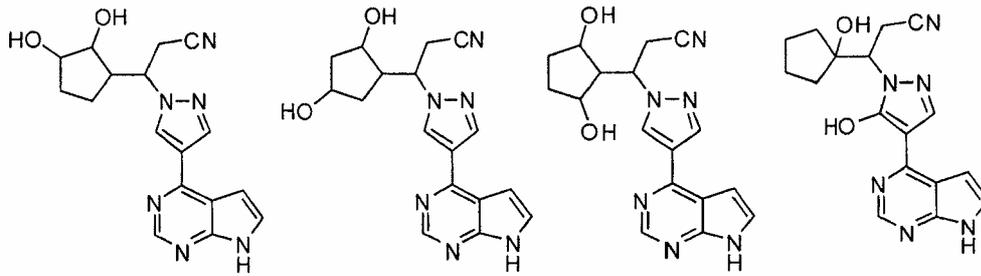
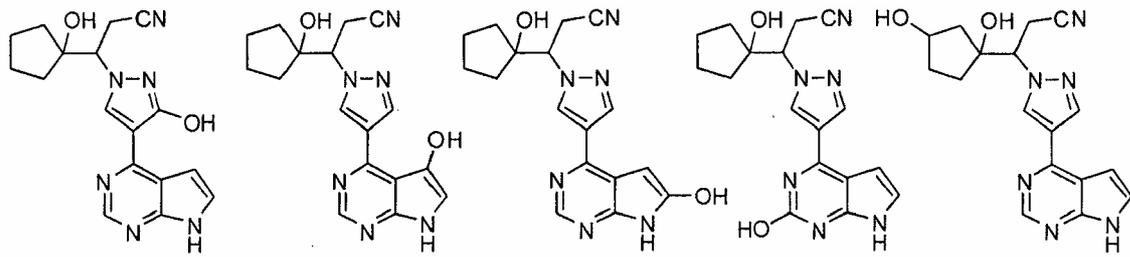
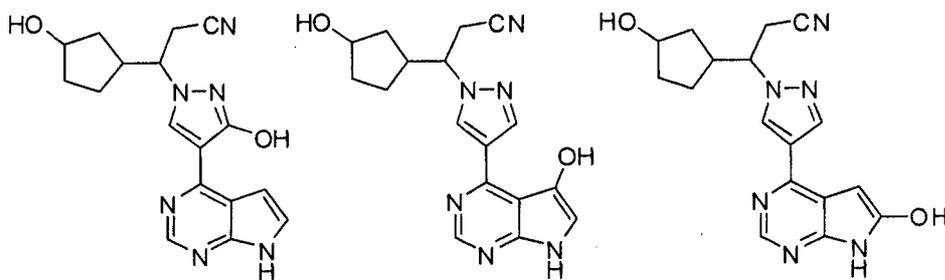
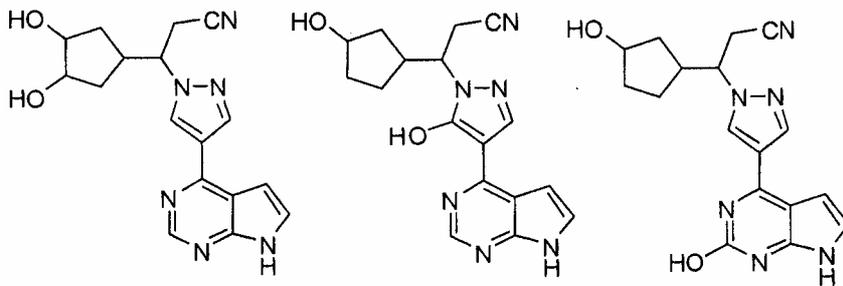


Diagrama 3



5

Diagrama 4

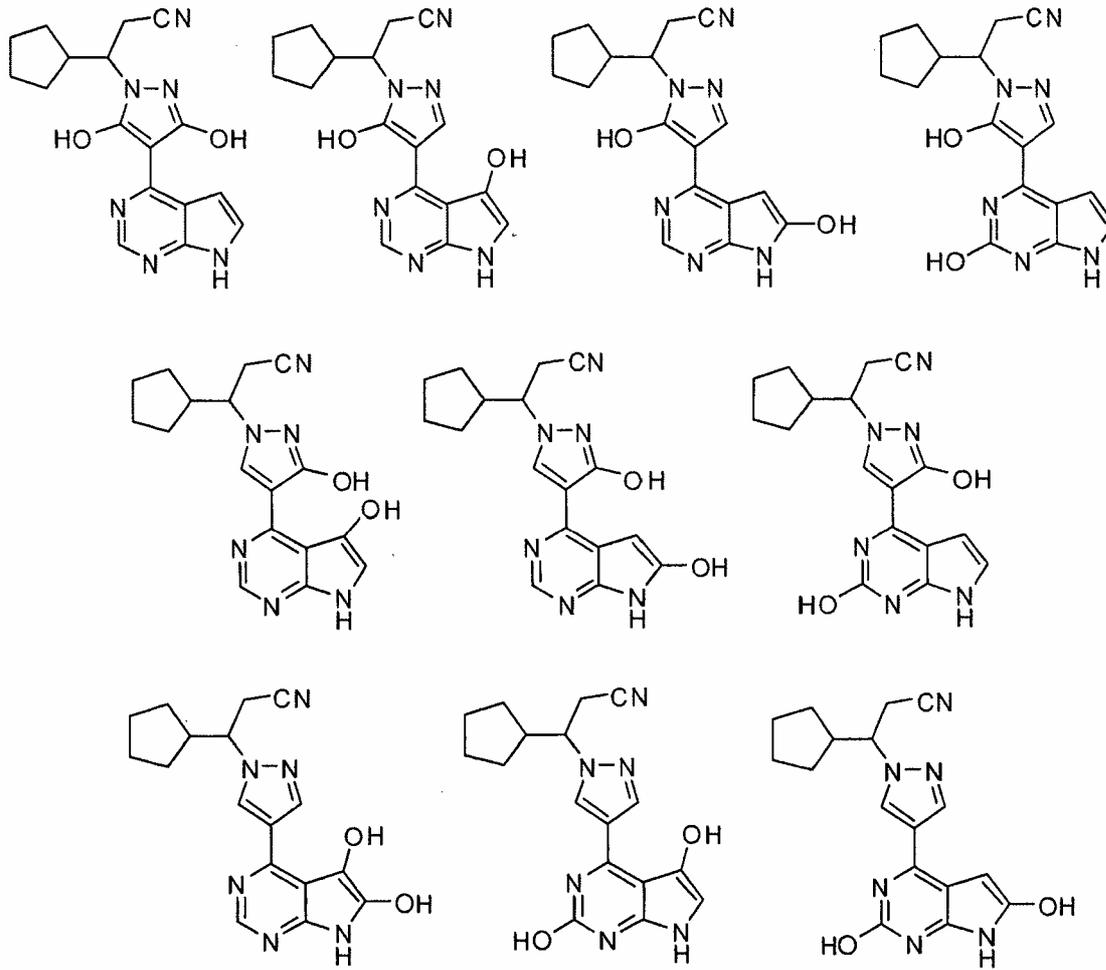


Diagrama 5

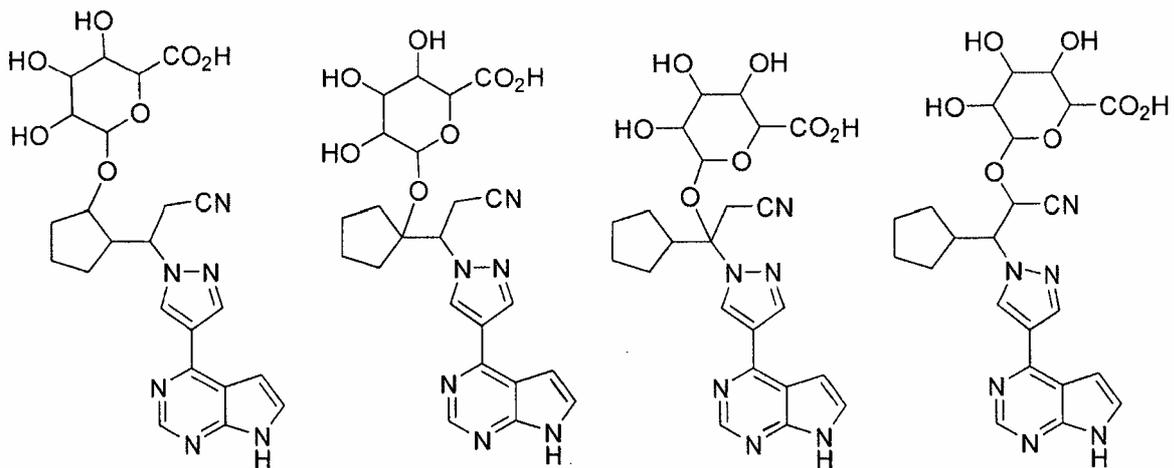


Diagrama 6

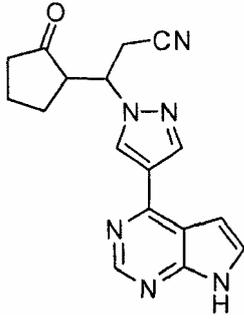
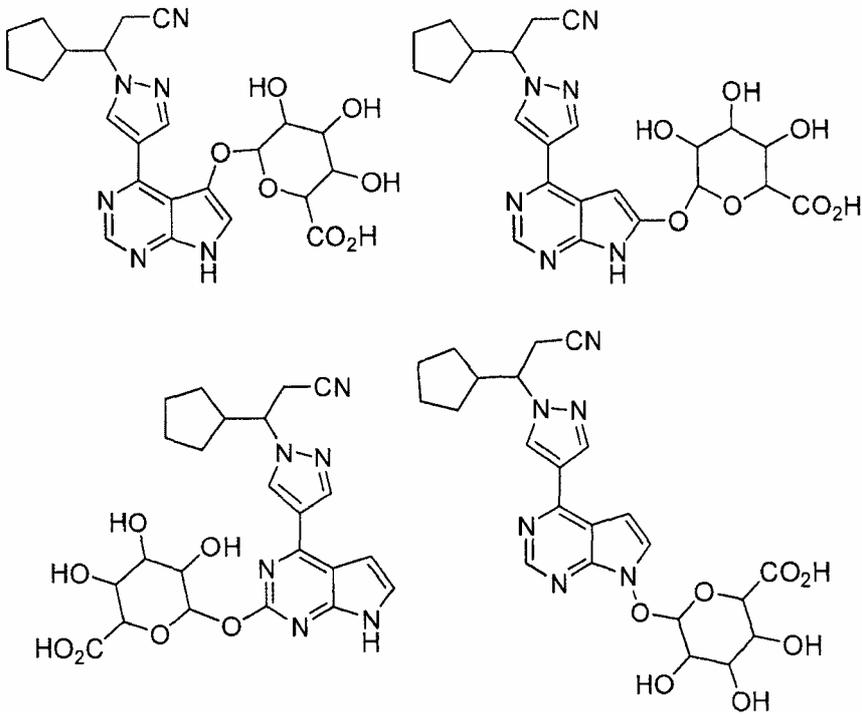


Diagrama 7



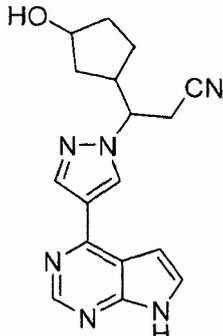
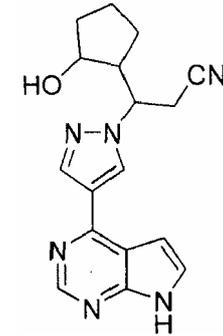
5

Se indican determinados metabolitos en la tabla 1 a continuación. Se prevé que las estructuras abarquen todos los estereoisómeros posibles.

10 Tabla 1

| Referencia*           | Nombre  | Estructura |
|-----------------------|---|------------|
| Metabolito 1<br>(3/8) | ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico |            |

|                      |  |  |
|----------------------|--|--|
| Metabolito 2<br>(31) | 3-ciclopentil-3-(4-(2,6-dioxo-3,5,6,7-tetraidro-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo  |  |
| Metabolito 3<br>(32) | 3-ciclopentil-3-(4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo  |  |
| Metabolito 4<br>(35) | 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1,2-dihidroxiciclopentil)propanonitrilo               |  |
| Metabolito 5<br>(36) | 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil)propanonitrilo                   |  |
| Metabolito 6<br>(37) | 3-ciclopentil-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo            |  |
| Metabolito 7<br>(38) | 3-(3-hidroxiciclopentil)-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo |  |

|              |  |   |
|--------------|--|---|
| Metabolito 8 | 3-(4-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo |  |
| Metabolito 9 | 3-(4-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-hidroxiciclopentil)propanonitrilo |  |

\* Los números entre paréntesis se refieren a los números de compuesto en la tabla 2 (véase a continuación)

Los compuestos descritos en el presente documento son metabolitos de (R)-3-(4-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo. Los metabolitos de la invención se aislaron a partir de muestras de orina de ser humano, rata o perro recogidas a partir de estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos del inhibidor de JAK (R)-3-(4-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo (compuesto I). Determinados metabolitos pueden ser inhibidores de JAK, y pueden tener propiedades ventajosas relacionadas con fracciones libres significativamente superiores y estabilidad metabólica superior en microsomas humanos en comparación con el compuesto I. Los presentes metabolitos pueden tener deseablemente semivida de eliminación más larga en seres humanos que el compuesto I.

En algunas realizaciones, los metabolitos de la invención están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislados" quiere decirse que el compuesto está al menos parcial o sustancialmente separado del entrono en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% en peso del metabolito.

La presente invención también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos dados a conocer en los que el compuesto original se modifica convirtiendo un resto de ácido o de base existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácido orgánico o mineral de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una razón beneficio/riesgo razonable.

Los compuestos descritos en el presente documento son asimétricos (por ejemplo, teniendo uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, están previstos a menos que se indique lo contrario. En la técnica se conocen métodos de cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos, tal como mediante resolución de mezclas racémicas o mediante síntesis estereoselectiva.

Los compuestos descritos en el presente documento también incluyen todos los isótopos de átomos que se producen en los metabolitos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los compuestos también pueden incluir solvatos e hidratos de los compuestos o formas de sal.

El término "compuesto," tal como se usa en el presente documento pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas.

### 15 *Síntesis*

Los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo sales de los mismos, pueden prepararse usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden sintetizarse según cualquiera de las numerosas rutas sintéticas posibles.

Las reacciones para preparar los compuestos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica de síntesis orgánica. Los disolventes orgánicos pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactantes), los productos intermedios o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, por ejemplo, temperaturas que pueden oscilar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición de disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, el experto en la técnica puede seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

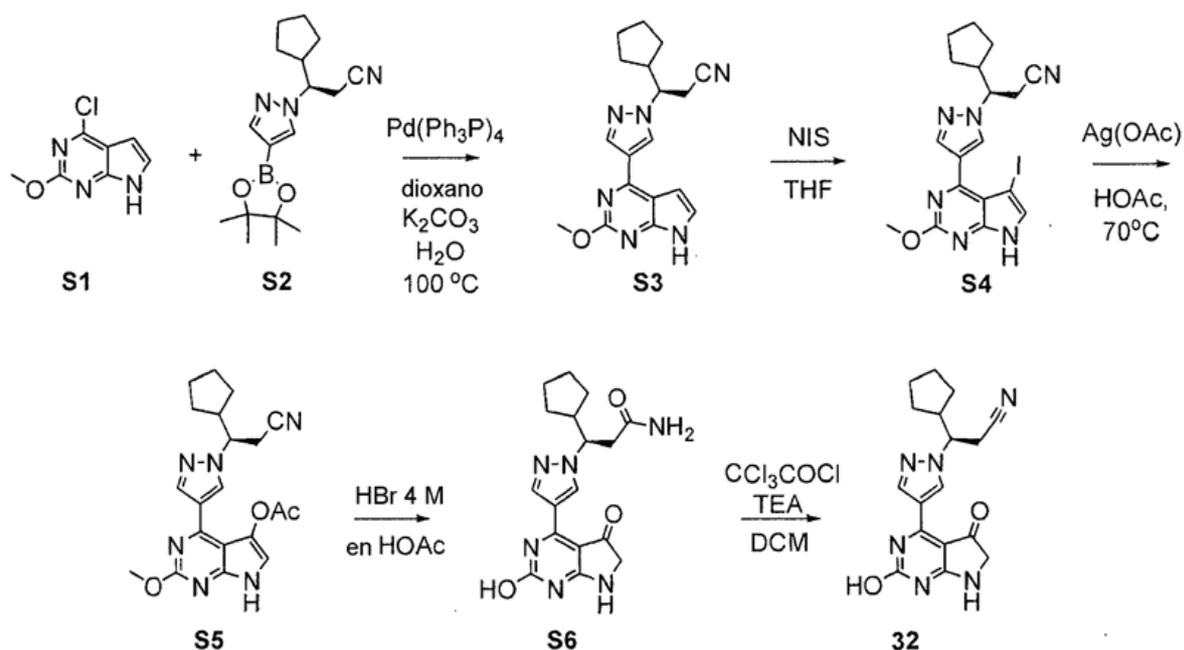
La preparación de compuestos descritos en el presente documento puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados. La química de grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>a</sup>. ed., Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999).

Las reacciones pueden monitorizarse según cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de producto puede monitorizarse mediante medios espectroscópicos, tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, <sup>1</sup>H o <sup>13</sup>C), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible) o espectrometría de masas, o mediante cromatografía tal como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse según numerosas rutas preparatorias conocidas en la bibliografía. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden producirse mediante procedimientos análogos a los descritos en el documento U.S. con número de serie 11/637.545 (documento US 2007/0135461), presentado el 12 de diciembre de 2006; el documento U.S. con número de serie 12/138.082 (documento US 2009/0181959), presentado el 16 de julio de 2009; y el documento U.S. con número de serie 12/137.883 (US 2008/0312258), presentado el 12 de junio de 2008. Se proporcionan ejemplos de métodos sintéticos para preparar los compuestos descritos en el presente documento en los esquemas a continuación.

Tal como se muestra en el esquema 1, la síntesis del compuesto 32 comienza con 4-cloro-pirrolopirimidina S1. El acoplamiento de Suzuki de S1 con el boronato de pirazol S2 en condiciones básicas en presencia de catalizador de Pd (0) puede proporcionar el compuesto tricíclico S3 que posteriormente se convierte selectivamente en el compuesto de yodo S4 usando N-yodosuccinimida. El compuesto de yodo S4 se transforma en el acetato S5 correspondiente. El tratamiento de S5 con bromuro de hidrógeno 4 M en ácido acético proporciona S6 con la oxidación deseada en el anillo de pirrol junto con la desprotección del grupo metoxilo para dar el hidroxilo libre. El grupo ciano que se hidrolizó para dar la amida en estas condiciones se reinstala en 32 mediante tratamiento de S6 con cloruro de tricloroacetilo y trietilamina para efectuar la deshidratación.

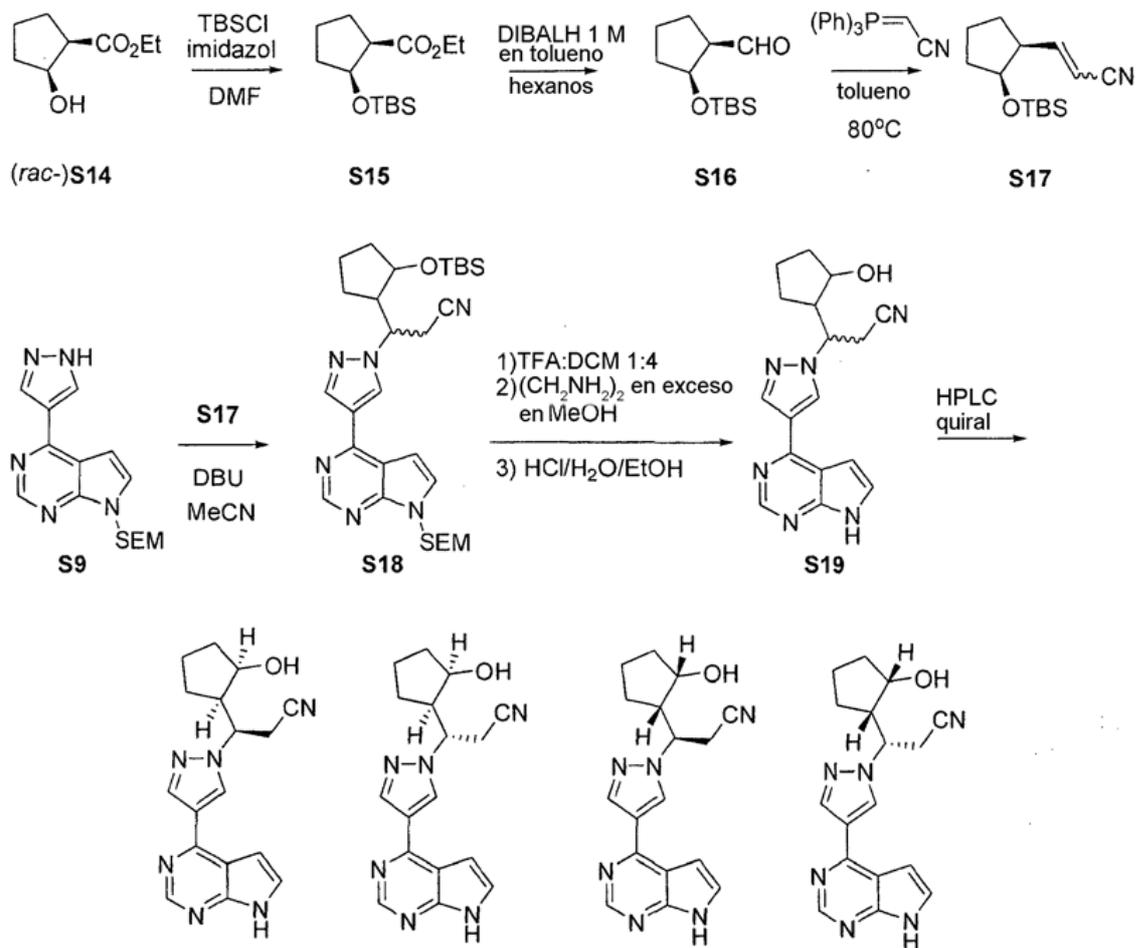
### 60 Esquema 1



El compuesto 42 monohidroxilado (metabolito 8) se ha notificado en el documento U.S. con número de serie 12/137.883, presentado el 12 de junio de 2008. Además, los compuestos que tienen un grupo hidroxilo en el anillo de ciclopentilo también pueden sintetizarse como en el esquema 2. Por ejemplo, el S14 racémico disponible comercialmente en el que se protege el alcohol seguido por reducción del éster carboxílico para dar el aldehído seguido por una olefinación del aldehído para proporcionar S17. La adición conjugada de S9 a S17 en condiciones básicas proporciona S18 del cual se eliminan los grupos protectores en el alcohol y el anillo de pirrol secuencialmente para proporcionar una mezcla de diastereómeros que entonces se separan usando múltiples columnas de HPLC quiral para proporcionar los cuatro diastereómeros de S19. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de producción del compuesto 42, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende una o más de las etapas en el esquema 2.

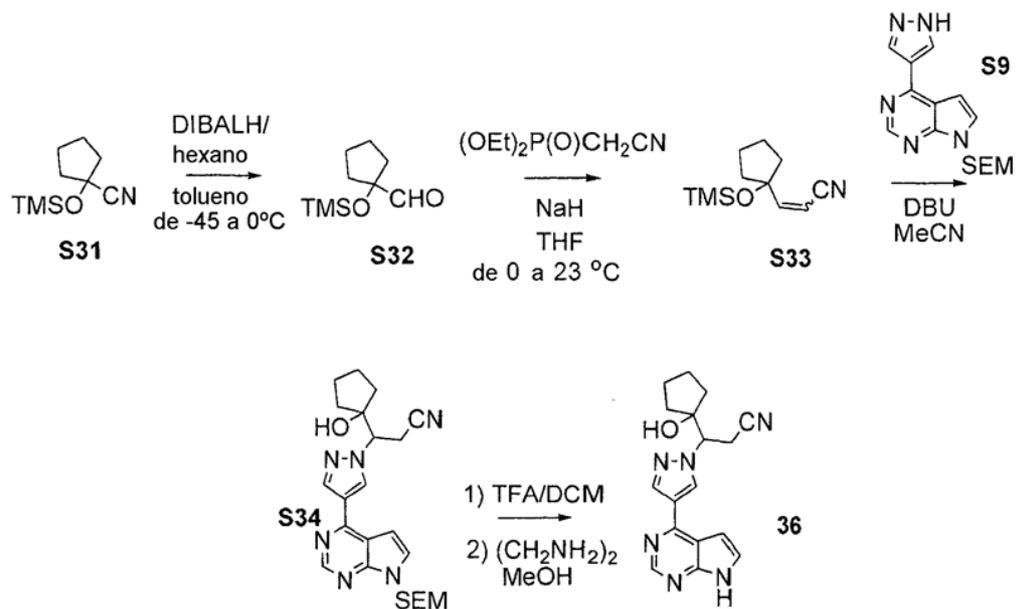
#### Esquema 2

15



Otro ejemplo del compuesto 36 monohidroxilado se obtiene mediante la secuencia mostrada en el esquema 3. La cianohidrina S31 protegida puede reducirse con DIBAL para dar el aldehído correspondiente seguido por la olefinación con el fosfonato tal como S7 para proporcionar el crotonitrilo S33. La adición conjugada de S9 a S33 en condiciones básicas proporciona S34 del que se elimina el grupo protector en el anillo de pirrol para proporcionar una mezcla de diastereómeros que entonces puede separarse usando múltiples columnas de HPLC quiral para proporcionar el estereoisómeros individual de 36.

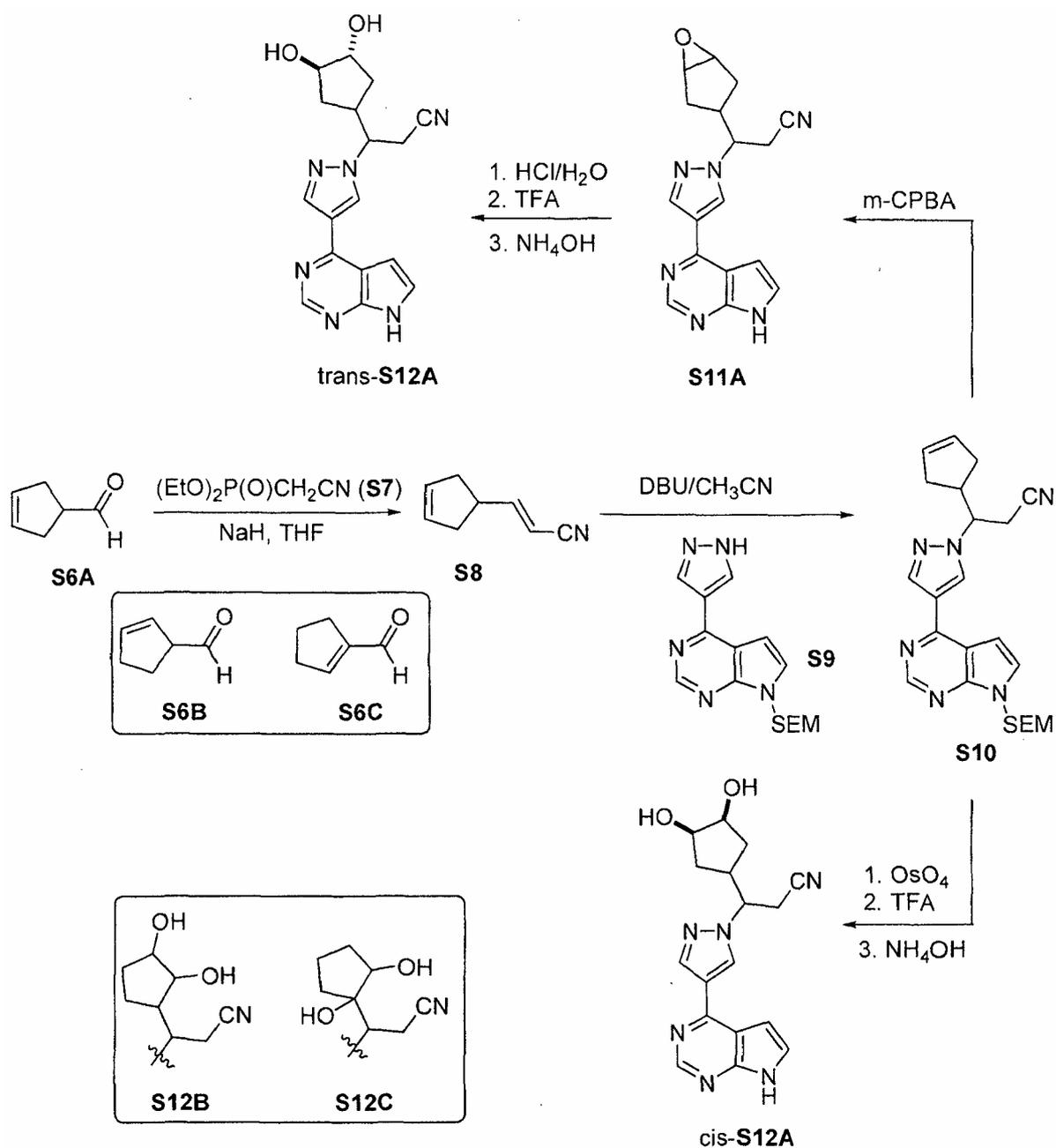
10 Esquema 3



- Los metabolitos dihidroxilados pueden obtenerse de un modo similar tal como se muestra en el esquema 4: puede tratarse el ciclopentenocarboxaldehído S6A directamente con el iluro S7 para dar el derivado de crotonitrilo S8. Entonces puede hacerse reaccionar el nitrilo S8 con el pirazol S9 en presencia de una base tal como DBU para dar S10 como una mezcla de diastereómeros, que pueden dihidroxilarse con tetróxido de osmio para proporcionar los alcoholes cis cis-S12A, tras la eliminación del grupo SEM. Los estereoisómeros individuales de esta mezcla (cis-S12A) pueden separarse mediante cromatografía quiral para dar los alcoholes enantioméricamente puros. El trans-S12A puede obtenerse epoxidando en primer lugar la olefina con m-CPBA seguido por apertura del epóxido en condiciones ácidas. Los estereoisómeros individuales de esta mezcla (trans-S12A) pueden separarse mediante cromatografía quiral para dar los alcoholes enantioméricamente puros. La misma ruta sintética puede adaptarse para obtener los S12B y S12C isoméricos sustituyendo el aldehído S6A de partida por S6B y S6C.

#### Esquema 4

15



Una combinación de los métodos descritos anteriormente junto con los descritos en solicitud de patente estadounidense con número de serie 11/637.545, presentada el 12 de diciembre de 2006; y en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 12/137.883, presentada el 12 de junio de 2008, puede utilizarse para obtener los compuestos de trihidroxilo de la invención. Por ejemplo, los compuestos de hidroxilo y dihidroxilo descritos en el presente documento pueden oxidarse en condiciones de oxidación de Swern descritas en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 12/137.883, presentada el 12 de junio de 2008. Los glucurónidos de metabolitos que contienen grupos hidroxilo pueden sintetizarse según el procedimiento de Suzuki *et al.* (Bioorg. Med. Chem. Lett. (1999), 9(5), 659-662).

#### Métodos

Determinados compuestos descritos en el presente documento pueden modular la actividad de una o más cinasas Janus (JAK). El término "modular" se entiende que se refiere a una capacidad de aumentar o disminuir la actividad de uno o más miembros de la familia JAK de cinasas. Por consiguiente, determinados compuestos descritos en el presente documento pueden usarse en métodos de modulación de una JAK poniendo en contacto la JAK con uno cualquiera o más de los compuestos o las composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, determinados compuestos pueden actuar como inhibidores de una o más JAK. En algunas realizaciones, determinados compuestos descritos en el presente documento pueden actuar estimulando la actividad

de una o más JAK. En realizaciones adicionales, pueden usarse determinados compuestos para modular la actividad de una JAK en un individuo que necesita la modulación el receptor administrando una cantidad moduladora de un compuesto de la invención.

- 5 Las JAK a las que se unen y/o modulan compuestos pueden incluir cualquier miembro de la familia JAK. En algunas realizaciones, la JAK es JAK1, JAK2, JAK3 o TYK2. En algunas realizaciones, la JAK es JAK1 o JAK2. En algunas realizaciones, la JAK es JAK2. En algunas realizaciones, la JAK es JAK3.

- 10 En algunas realizaciones, los compuestos activos pueden ser selectivos. Por "selectivos" quiere decirse que el compuesto se une a o inhibe una JAK con mayor afinidad o potencia, respectivamente, en comparación con al menos otra JAK (por ejemplo, inhibidores selectivos de JAK1 o JAK2 con respecto a JAK3 y/o TYK2). En algunas realizaciones, selectivo significa inhibición selectiva de JAK2 (por ejemplo, con respecto a JAK1, JAK3 y TYK2). Sin querer limitarse a ninguna teoría, debido a que los inhibidores de JAK3 pueden conducir a efectos inmunosupresores, un compuesto que es selectivo para JAK2 con respecto a JAK3 y que es útil en el tratamiento de
- 15 cáncer (tal como mieloma múltiple, por ejemplo) puede ofrecer la ventaja adicional de tener menos efectos secundarios inmunosupresores. La selectividad puede ser de al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces. La selectividad puede medirse mediante métodos de rutina en la técnica. En
- 20 algunas realizaciones, la selectividad puede someterse a prueba a la Km de cada enzima. En algunas realizaciones, la selectividad para JAK2 con respecto a JAK3 puede determinarse mediante la concentración de ATP celular.

- Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un enfermedad o trastorno asociado a JAK en un individuo (por ejemplo, paciente) administrando al individuo que necesita tal tratamiento una cantidad o
- 25 dosis terapéuticamente eficaz de un determinado compuesto descrito en el presente documento o una composición farmacéutica del mismo. Una enfermedad asociada a JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o estado que está directa o indirectamente vinculado a la expresión o actividad de la JAK, incluyendo sobreexpresión y/o niveles de actividad anómalos. Una enfermedad asociada a JAK también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o estado que puede impedirse, mejorarse o curarse modulando la actividad de JAK.

- 30 Los ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades que implican al sistema inmunitario incluyendo, por ejemplo, rechazo de trasplante de órganos (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped).

- 35 Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, diabetes tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulinas, trastorno de tiroides autoinmunitario, y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno cutáneo ampolloso autoinmunitario tal como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide ampolloso (PA).

- 40 Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a JAK incluyen estados alérgicos tales como asma, alergias alimentarias, dermatitis atópica y rinitis. Los ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades virales tales como virus de Epstein Barr (VEB), hepatitis B, hepatitis C, VIH, VLTH 1, virus de la varicela zóster (VVZ) y virus del papiloma humano (VPH).

- 45 Los ejemplos adicionales de enfermedades o estados asociados a JAK incluyen trastornos cutáneos tales como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgar), dermatitis atópica, exantema cutáneo, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto, dermatitis de contacto alérgica o sensibilización por contacto alérgica). Por ejemplo, determinadas sustancias, incluyendo algunos productos farmacéuticos, cuando se aplican por vía
- 50 tópica pueden provocar sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, la administración conjunta o la administración secuencial de al menos un inhibidor de JAK junto con el agente que provoca la sensibilización no deseada, puede ser útil en el tratamiento de tal sensibilización no deseada o dermatitis. En algunas realizaciones, el trastorno cutáneo se trata mediante administración tópica de al menos un inhibidor de JAK.

- 55 En realizaciones adicionales, la enfermedad asociada a JAK es cáncer incluyendo los caracterizados por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, melanoma etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia, tal como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda (LMA) o mieloma múltiple), y cáncer de piel tal como
- 60 linfoma de células T cutáneo (LCTC) y linfoma de células B cutáneo. Los ejemplos de linfomas de células T cutáneos incluyen síndrome de Sezary y micosis fungoide.

- Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir además la caracterizadas por la expresión de: mutantes de JAK2 tales como los que tienen al menos una mutación en el dominio pseudo-cinasa (por ejemplo, JAK2V617F); mutantes
- 65 de JAK2 que tienen al menos una mutación fuera del dominio pseudo-cinasa; mutantes de JAK1; mutantes de JAK3; mutantes del receptor de eritropoyetina (EPOR); o expresión desregulada de CRLF2.

Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir además trastornos mieloproliferativos (MPD) tales como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mielóide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE), enfermedad de mastocitosis sistémica (SMCD), y similares.

Las enfermedades asociadas a JAK adicionales incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, ojo seco, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis o enfermedades relacionadas), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo, las vías respiratorias superiores incluyendo la nariz y los senos tales como rinitis o sinusitis o las vías respiratorias inferiores incluyendo bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y similares), miopatía inflamatoria tal como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias. Otras enfermedades inflamatorias que pueden tratarse mediante inhibidores de JAK incluyen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y choque septicémico.

Tal como se usa en el presente documento, “trastorno de ojo seco” pretende abarcar los estados patológicos resumidos en un informe oficial reciente de Dry Eye Workshop (DEWS), que define el ojo seco como “una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que da como resultado síntomas de malestar, alteraciones visuales e inestabilidad de la película lacrimal con daño potencial a la superficie ocular. Va acompañada por un aumento de la osmolaridad de la película lacrimal e inflamación de la superficie ocular”. Lemp, “The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop”, *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92, abril de 2007. En algunas realizaciones, el trastorno de ojo seco se selecciona de ojo seco deficiente en lágrimas acuosas (ADDE) o trastorno de ojo seco evaporativo, o combinaciones apropiadas de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno de ojo seco es ojo seco de síndrome de Sjogren (SSDE). En algunas realizaciones, el trastorno de ojo seco es ojo seco distinto de síndrome de Sjogren (NSSDE).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de tratamiento de conjuntivitis, uveítis (incluyendo uveítis crónica), corioditis, retinitis, ciclitis, escleritis, epiescleritis o iritis; tratamiento de inflamación o dolor relacionado con trasplante de córnea, LASIK (queratomileusis *in situ* asistida por láser), queratectomía fotorrefractiva o LASEK (queratomileusis subepitelial asistida por láser); inhibición de la pérdida de agudeza visual relacionada con trasplante de córnea, LASIK, queratectomía fotorrefractiva o LASEK; o inhibición del rechazo de trasplante en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Pueden usarse adicionalmente inhibidores de JAK para tratar lesiones de isquemia por reperfusión o una enfermedad o estado relacionado con un acontecimiento isquémico inflamatorio tal como accidente cerebrovascular o paro cardíaco. Pueden usarse adicionalmente inhibidores de JAK para tratar anorexia, caquexia o fatiga tal como la que resulta de o está asociada con cáncer. Pueden usarse adicionalmente inhibidores de JAK para tratar reestenosis, esclerodermis o fibrosis. Pueden usarse adicionalmente inhibidores de JAK para tratar estados asociados con hipoxia o astrogliosis tales como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer o neurodegeneración. Véanse, por ejemplo, Dudley, A.C. *et al.* *Biochem. J.* 2005, 390(Pt 2):427-36 y Sriram, K. *et al.* *J. Biol. Chem.* 2004, 279(19):19936-47. Publicación electrónica 2 de marzo de 2004.

Pueden usarse adicionalmente inhibidores de JAK para tratar la gota y el aumento del tamaño de la próstata debido a, por ejemplo, hipertrofia benigna de próstata o hiperplasia prostática benigna.

Las enfermedades asociadas a JAK adicionales incluyen enfermedades de resorción ósea tales como osteoporosis, osteoartritis. La resorción ósea también puede estar asociada con otros estados tales como desequilibrio hormonal y/o terapia hormonal, enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo sarcoidosis ósea), o cáncer (por ejemplo mieloma). La reducción de la resorción ósea debido a los inhibidores de JAK puede ser de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80% o aproximadamente el 90%.

Tal como se usa en el presente documento, el término “poner en contacto” se refiere a juntar los restos indicados en un sistema *in vitro* o un sistema *in vivo*. Por ejemplo, “poner en contacto” una JAK con un compuesto incluye la administración de un compuesto de la presente invención a un individuo o paciente, tal como un ser humano, que tiene una JAK, así como, por ejemplo, introducir un compuesto en una muestra que contiene una preparación celular o purificada que contiene la JAK.

Tal como se usa en el presente documento, el término “individuo” o “paciente,” usado de manera intercambiable, se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos o primates, y lo más preferiblemente seres humanos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de agente farmacéutico o compuesto activo que produce la respuesta biológica o medicinal que se busca en un

tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

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

Los niveles de metabolitos en un paciente tras la administración del compuesto I en un individuo pueden medirse y obtenerse su perfil. Tal perfil de metabolitos puede usarse entonces para ajustar los regímenes de dosificación (por ejemplo, para la administración del compuesto I) en ese individuo. Por ejemplo, un aclaramiento más rápido del compuesto I tal como se muestra mediante niveles de diversos metabolitos tras un periodo de tiempo dado, puede significar que las dosificaciones iniciales deben ajustarse hacia arriba.

#### *Terapias de combinación*

Pueden usarse uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como, por ejemplo, agentes quimioterápicos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, así como inhibidores de Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK cinasa tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2006/056399, u otros agentes en combinación con determinados compuestos descritos en el presente documento para el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados asociados a JAK. El uno o más agentes farmacéuticos adicionales puede administrarse a un paciente simultánea o secuencialmente.

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

Los ejemplos de esteroides incluyen corticosteroides tales como dexametasona o prednisona.

Los ejemplos de inhibidores de Bcr-Abl incluyen los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de los géneros y especies dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.521.184, el documento WO 04/005281 y el documento U.S. con número de serie 60/578.491.

Los ejemplos de inhibidores de Flt-3 adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se dan a conocer en los documentos WO 03/037347, WO 03/099771 y WO 04/046120.

Los ejemplos de inhibidores de RAF adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se dan a conocer en los documentos WO 00/09495 y WO 05/028444.

Los ejemplos de inhibidores de FAK adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como se dan a conocer en los documentos WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 y WO 01/014402.

En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más compuestos descritos en el presente documento en combinación con uno o más de otros inhibidores de cinasas incluyendo imatinib, particularmente para tratar pacientes resistentes a imatinib u otros inhibidores de cinasas.

En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más compuestos en combinación con un agente quimioterápico en el tratamiento de cáncer, tal como mieloma múltiple, y puede mejorar la respuesta al tratamiento en comparación con la respuesta al agente quimioterápico solo, sin exacerbación de sus efectos tóxicos. Los ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple, por ejemplo, pueden incluir, sin limitación, melfalán, melfalán más prednisona [MP], doxorubicina, dexametasona y Velcade (bortezomib). Más agentes adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple incluyen inhibidores de Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK cinasa. Efectos aditivos o sinérgicos son deseables de la combinación de un compuesto de la presente invención con un agente adicional. Además, la resistencia de células de mieloma múltiple a agentes tales como dexametasona puede ser reversible tras el tratamiento con un compuesto de la presente invención. Los agentes pueden combinarse con el inhibidor de JAK en una forma farmacéutica individual o continua, o los agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente como formas farmacéuticas separadas.

En algunas realizaciones, se administra un corticosteroide tal como dexametasona a un paciente en combinación con al menos un inhibidor de JAK en el que la dexametasona se administra de manera intermitente en contraposición a de manera continua.

En algunas realizaciones adicionales, pueden administrarse combinaciones de uno o más compuestos con otros agentes terapéuticos a un paciente antes de, durante y/o tras un trasplante de médula ósea o trasplante de células madre.

##### 5 *Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación*

10 Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden prepararse de manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y pueden administrarse por una variedad de vías, dependiendo de si se desea  
 15 tratamiento local o sistémico y de la zona que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratecal o intranasal), oral o parenteral. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para administración  
 20 oral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una dosis en bolo simple, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. Preservativos, guantes y similares recubiertos también pueden ser útiles.

25 Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (excipientes). En la preparación de las composiciones de la invención, el principio activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se incluye dentro de un portador de este tipo en forma de, por ejemplo, una cápsula, un sobre, un papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente,  
 30 puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el principio activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, cachets, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

35 En la preparación de una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinar con los otros componentes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula de menos de 200 de malla. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula puede ajustarse mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo de aproximadamente 40 de malla.

40 El principio activo puede molerse usando procedimientos de molienda conocidos tales como molienda en húmedo para obtener un tamaño de partícula apropiado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulación. Pueden prepararse preparaciones del principio activo finamente divididas (nanoparticulados) mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo véase la solicitud de patente internacional n.º WO 2002/000196.

45 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, goma tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de modo que proporcionen liberación  
 50 rápida, sostenida o retardada del principio activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

55 Las composiciones pueden formularse en una forma farmacéutica unitaria, conteniendo cada dosificación desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 1000 mg (1 g), más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg, del principio activo. El término "formas farmacéuticas unitarias" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

60 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 50 mg del principio activo. El experto habitual en la técnica apreciará que esto expresa compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 30 mg, de  
 65 aproximadamente 30 mg a aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 35 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 45 mg o de aproximadamente 45 mg a aproximadamente 50 mg del

principio activo.

5 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo. El experto habitual en la técnica apreciará que esto expresa compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 350 mg a aproximadamente 400 mg o de aproximadamente 450 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo.

10 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen desde aproximadamente 500 mg hasta aproximadamente 1.000 mg del principio activo. El experto habitual en la técnica apreciará que esto expresa compuestos o composiciones que contienen de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 550 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 600 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 650 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 750 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 850 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 900 mg a aproximadamente 950 mg o de aproximadamente 950 mg a aproximadamente 1.000 mg del principio activo.

15 El compuesto activo puede ser eficaz a lo largo de un amplio intervalo de dosificación y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del compuesto administrada realmente se determinará habitualmente por un médico, según las circunstancias relevantes, incluyendo el estado que va a tratarse, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

20 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el principio activo principal con un excipiente farmacéutico para formar una composición de formulación previa sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de formulación previa como homogéneas, el principio activo está disperso normalmente de manera uniforme por toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. La formulación previa sólida se subdivide entonces en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen desde, por ejemplo, aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1000 mg del principio activo de la presente invención.

25 Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o combinarse de otra manera para proporcionar una forma farmacéutica que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y uno de dosificación externa, estando este último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse mediante una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que sea de liberación retardada. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

30 Las formas líquidas en las que pueden incorporarse los compuestos y las composiciones para su administración por vía oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas o en aceite y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

35 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones sólidas o líquidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tal como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para lograr un efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una cubierta de una máscara facial, o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones de disolución, suspensión o de polvo por vía oral o por vía nasal desde dispositivos que administran la formulación de manera apropiada.

40 La cantidad de compuesto o composición administrada a un paciente variará dependiendo de qué está administrándose, el fin de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la manera de administración, y similares. En aplicaciones terapéuticas, pueden administrarse composiciones a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos parar parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis eficaces dependerán del estado patológico que está tratándose así como del juicio del facultativo encargado dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el estado general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en forma de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Pueden envasarse disoluciones acuosas para su uso tal como están, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones de compuesto normalmente estará entre 3 y 11, más preferiblemente desde 5 hasta 9 y lo más preferiblemente desde 7 hasta 8. Se entenderá que el uso de determinados excipientes, portadores o estabilizadores anteriores dará como resultado la formación de sales farmacéuticas.

La dosificación terapéutica de los compuestos puede variar según, por ejemplo, el uso particular para el que se prepara el tratamiento, la manera de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el juicio del médico que prescribe. La proporción o concentración de un compuesto en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores incluyendo características de dosificación, químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos pueden proporcionarse en una disolución tampón fisiológica acuosa que contiene de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg de peso corporal al día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. La dosificación depende posiblemente de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o el trastorno, el estado de salud global del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelo animal.

Las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como un agente quimioterápico, esteroide, compuesto antiinflamatorio o inmunosupresor, ejemplos de los cuales se enumeraron anteriormente en el presente documento.

En algunas realizaciones, el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como una composición oftálmica. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador aceptable por vía oftálmica. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición líquida, composición semisólida, inserto, película, micropartículas o nanopartículas.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición líquida. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición semisólida. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición tópica. Las composiciones tópicas incluyen, pero no se limitan a composiciones líquidas y semisólidas. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición tópica. En algunas realizaciones, la composición tópica comprende disolución acuosa, una suspensión acuosa, una pomada o un gel. En algunas realizaciones, la composición oftálmica se aplica por vía tópica a la parte frontal del ojo, bajo el párpado superior, en el párpado inferior y en el fondo de saco. En algunas realizaciones, se esteriliza la composición oftálmica. La esterilización puede lograrse mediante técnicas conocidas como esterilización por filtración de la disolución o mediante calentamiento de la disolución en la ampolla lista para su uso. Las composiciones oftálmicas de la invención pueden contener además excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Ejemplos de tales excipientes son agentes conservantes, agentes tamponantes, agentes quelantes, agentes antioxidantes y sales para regular la presión osmótica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador aceptable por vía oftálmica" se refiere a cualquier material que pueda contener y liberar el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y que sea compatible con el ojo. En algunas realizaciones, el portador aceptable por vía oftálmica es agua o una disolución o suspensión acuosa, pero también incluye aceites tales como los usados para preparar pomadas y matrices poliméricas tales como las usadas en insertos oculares. En algunas realizaciones, la composición puede ser una suspensión acuosa que comprende el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las composiciones oftálmicas líquidas, incluyendo tanto pomadas como suspensiones, pueden tener una viscosidad que es adecuada para la vía de administración seleccionada. En algunas realizaciones, la composición oftálmica tiene una viscosidad en el intervalo de desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 30.000 centipoise.

En algunas realizaciones, las composiciones oftálmicas pueden comprender además uno o más de tensioactivos, adyuvantes, tampones, antioxidantes, ajustadores de la tonicidad, conservantes (por ejemplo, EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, Poliquaterium-1), espesantes o modificadores de la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, glicol 400, hidroximetilcelulosa de propilenglicol, hidroxipropil-guar, ácido hialurónico e hidroxipropilcelulosa) y similares. Los aditivos en la formulación pueden incluir, pero no se limitan a, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, aceite de ricino y perborato de sodio.

Las composiciones oftálmicas acuosas (disoluciones o suspensiones) generalmente no contienen constituyentes fisiológica u oftálmicamente perjudiciales. En algunas realizaciones, se usa agua purificada o desionizada en la composición. El pH puede ajustarse añadiendo cualquier ácido, base o tampón de ajuste del pH fisiológica y

oftálmicamente aceptable para que esté dentro del intervalo de aproximadamente 5,0 a 8,5. Los ejemplos de ácidos oftálmicamente aceptables incluyen acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico, y similares, y los ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, trishidroximetilamino-metano, y similares. Las sales y los tampones incluyen citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y mezclas de los ácidos y las bases mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, los métodos implican formar o suministrar un depósito del agente terapéutico en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente del agente terapéutico que no se elimina rápidamente por las lágrimas u otros mecanismos de aclaramiento del ojo. Esto permite que estén presentes concentraciones altas sostenidas, continuadas de agente terapéutico en el fluido en la superficie externa del ojo mediante una única aplicación. Sin querer restringirse a ninguna teoría, se cree que la absorción y penetración pueden depender tanto de la concentración de fármaco disuelto como de la duración del contacto del tejido externo con el fluido que contiene fármaco. A medida que se elimina el fármaco mediante aclaramiento del fluido ocular y/o absorción en el tejido ocular, se proporciona más fármaco, por ejemplo disuelto, en el fluido ocular reabastecido a partir del depósito. Por consiguiente, el uso de un depósito puede facilitar más fácilmente la carga del tejido ocular para agentes terapéuticos más insolubles. En algunas realizaciones, el depósito puede permanecer durante hasta ocho horas o más. En algunas realizaciones, las formas de depósito oftálmico incluyen, pero no se limitan a, suspensiones poliméricas acuosas, pomadas e insertos sólidos.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una pomada o un gel. En alguna realización, la composición oftálmica es un vehículo de suministro a base de aceite. En algunas realizaciones, la composición comprende una base de petróleo o lanolina a la que se le añade el principio activo, habitualmente como del 0,1 al 2%, y excipientes. Las bases comunes pueden incluir, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la pomada se aplica como una banda sobre el párpado inferior.

En alguna realización, la composición oftálmica es un inserto oftálmico. En algunas realizaciones, el inserto oftálmico es biológicamente inerte, blando, bioerosionable, viscoelástico, estable a la esterilización tras la exposición a agentes terapéuticos, resistente a infecciones de bacterias transmitidas por el aire, bioerosionable, biocompatible, y/o viscoelástico. En algunas realizaciones, el inserto comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ejemplo, una matriz polimérica. La matriz es normalmente un polímero y el agente terapéutico está dispersado generalmente en el mismo o unido a la matriz polimérica. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede liberarse lentamente de la matriz a través de disolución o hidrólisis del enlace covalente. En algunas realizaciones, el polímero es bioerosionable (soluble) y la velocidad de disolución del mismo puede controlar la velocidad de liberación del agente terapéutico dispersado en el mismo. En otra forma, la matriz de polímero es un polímero biodegradable que se descompone tal como mediante hidrólisis liberando de ese modo el agente terapéutico unido al mismo o dispersado en el mismo. En realizaciones adicionales, la matriz y el agente terapéutico pueden estar rodeados por un recubrimiento polimérico adicional para controlar adicionalmente la liberación. En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero biodegradable tal como policaprolactona (PCL), un copolímero de etileno/acetato de vinilo (EVA), poli(cianoacrilato de alquilo), poliuretano, un nailon, o poli(di-lactida-co-glicolida) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está dispersado en el material de matriz o dispersado entre la composición de monómeros usada para preparar el material de matriz antes de la polimerización. En algunas realizaciones, la cantidad de agente terapéutico es de desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 50%, o desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 20%. En realizaciones adicionales, la matriz polimérica biodegradable o bioerosionable se usa de modo que el inserto gastado no tiene que eliminarse. A medida que se degrada o se disuelve el polímero biodegradable o bioerosionable, se libera el agente terapéutico.

En realizaciones adicionales, el inserto oftálmico comprende un polímero, incluyendo, pero sin limitarse, los descritos en Wagh, *et al.*, "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., páginas 12-17 (enero de 2008). En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero seleccionado de polivinilpirrolidona (PVP), un polímero o copolímero de acrilato o metacrilato (por ejemplo, la familia Eudragit® de polímeros de Rohm o Degussa), hidroximetilcelulosa, poli(ácido acrílico), dendrímeros de poli(amidoamina), poli(dimetilsiloxano), poli(óxido de etileno), poli(lactida-co-glicolida), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(alcohol vinílico) o poli(fumarato de propileno). En algunas realizaciones, el inserto comprende Gelfoam® R. En algunas realizaciones, el inserto es un poli(ácido acrílico) de conjugado de cisteína de 450 kDa.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una película oftálmica. Los polímeros adecuados para tales películas incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Wagh, *et al.* (ibidem). En algunas realizaciones, la película es una lente de contacto blanca, tal como las fabricadas a partir de copolímeros de N,N-dietilacrilamida y ácido metacrílico reticulados con dimetacrilato de etilenglicol.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica comprende microesferas o nanopartículas. En alguna realización, las microesferas comprenden gelatina. En algunas realizaciones, las microesferas se inyectan al segmento posterior del ojo, en el espacio coroideo, en la esclerótica, por vía intravítrea o por vía subretiniana. En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en Wagh, *et al.* (ibidem), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. En algunas

realizaciones, el polímero es quitosano, un poli(ácido carboxílico) tal como poli(ácido acrílico), partículas de albúmina, ésteres de ácido hialurónico, poli(ácido itacónico), poli(cianoacrilato de butilo), policaprolactona, poli(isobutil)caprolactona, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) o poli(ácido láctico). En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden partículas lipídicas sólidas.

5 En algunas realizaciones, la composición oftálmica comprende una resina de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una zeolita inorgánica o resina orgánica sintética. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico incluye, pero no se limita a, las descritas en Wagh, *et al.* (ibidem), que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es un poli(ácido acrílico) parcialmente neutralizado.

10 En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una suspensión polimérica acuosa. En algunas realizaciones, el agente terapéutico o un agente de suspensión polimérico se suspende en un medio acuoso. En algunas realizaciones, las suspensiones poliméricas acuosas pueden formularse de modo que conserven la misma o sustancialmente la misma viscosidad en el ojo que tenían antes de la administración al ojo. En algunas realizaciones, pueden formularse de modo que hay un aumento de la gelificación tras el contacto con el fluido lacrimal.

#### 20 *Compuestos marcados y métodos de ensayo*

Otro aspecto de la presente invención se refiere una versión marcada de determinados compuestos descritos en el presente documento (radiomarcados, marcados fluorescentemente, etc.) que serían útiles no sólo en técnicas de obtención de imágenes sino también en ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para localizar y cuantificar JAK en muestras de tejido, incluyendo ser humano, y para identificar ligandos de JAK mediante la inhibición de la unión de un compuesto marcado. Por consiguiente, la presente invención incluye ensayos de JAK que contienen tales compuestos marcados.

30 La presente invención incluye además compuestos marcados isotópicamente. Un compuesto "marcado isotópicamente" o "radiomarcado" es un compuesto descrito en el presente documento en el que uno o más átomos se reemplazan o se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico normalmente encontrado en la naturaleza (es decir, que se produce de manera natural). Los radionúclidos estables que pueden incorporarse en compuestos descritos en el presente documento incluyen pero no se limitan a  $^2\text{H}$  (también escrito como D para deuterio),  $^3\text{H}$  (también escrito como T para tritio),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ . El radionúclido que se incorpora en los presentes compuestos radiomarcados dependerá de la aplicación específica de ese compuesto radiomarcado. Por ejemplo, para ensayos de competición y marcaje de metaloproteasas *in vitro*, los compuestos que incorporan  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o serán generalmente los más útiles. Para aplicaciones de radio-obtención de imágenes,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$  o  $^{77}\text{Br}$  serán generalmente los más útiles.

40 Se entiende que un "compuesto radiomarcado" o "compuesto marcado" es un compuesto que ha incorporado al menos un radionúclido. En algunas realizaciones, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{121}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{82}\text{Br}$ .

45 La presente invención puede incluir adicionalmente métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos descritos en el presente documento. Se conocen bien en la técnica métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos orgánicos, y un experto habitual en la técnica reconocerá fácilmente los métodos aplicables para los compuestos descritos en el presente documento.

50 Puede usarse un compuesto marcado de la invención en un ensayo de selección para identificar/evaluar compuestos. Por ejemplo, puede evaluarse un compuesto recién sintetizado o identificado (es decir, compuesto de prueba) que está marcado para determinar su capacidad para unirse a una JAK monitorizando su variación de concentración cuando se pone en contacto con la JAK, a través del seguimiento del marcaje. Por ejemplo, puede evaluarse un compuesto de prueba (marcado) para determinar su capacidad para reducir la unión de otro compuesto que se sabe que se une a una JAK (es decir, compuesto patrón). Por consiguiente, la capacidad de un compuesto de prueba para competir con el compuesto patrón por la unión a la JAK se correlaciona directamente con su afinidad de unión. A la inversa, en algunos otros ensayos de selección, el compuesto patrón está marcado y los compuestos de prueba están sin marcar. Por consiguiente, se monitoriza la concentración del compuesto patrón marcado con el fin de evaluar la competición entre el compuesto patrón y el compuesto de prueba, y por tanto se establece la afinidad de unión relativa del compuesto de prueba.

#### 60 *Kits*

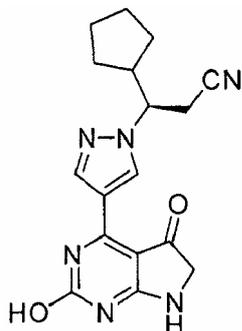
65 La presente invención también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos asociados a JAK, tales como cáncer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente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

tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., tal como resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También pueden incluirse en el kit instrucciones, o bien como prospectos o bien como etiquetas, que indican las cantidades de los componentes que van a administrarse, directrices para su administración, y/o directrices para mezclar los componentes.

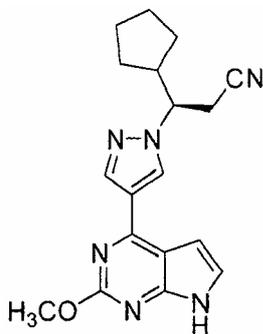
La invención se describirá en mayor detalle a modo de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados.

## Ejemplos

Ejemplo 1: (R)-3-Ciclopentil-3-[4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-SH-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

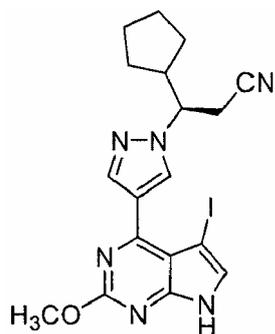


*Etapas 1. (R)-3-Ciclopentil-3-[4-(2-metoxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*



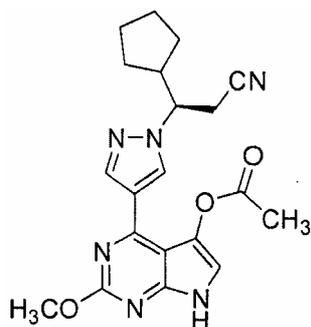
Se disolvieron 4-cloro-2-metoxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidina (0,4 g, 2,18 mmol, Toronto Research Chemicals) y (R)-3-ciclopentil-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (0,824 g, 2,61 mmol, preparado tal como se describe en Org. Lett., 2009, 11(9), 1999-2002.) en 1,4-dioxano (4 ml) y se añadió carbonato de potasio (0,903 g, 6,54 mmol) en agua (2 ml). Se desgasificó la mezcla y se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,126 g, 0,109 mmol). Se calentó la mezcla de reacción hasta 100°C durante 16 h. Se repartió la mezcla de reacción entre agua y acetato de etilo. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo tres veces. Se secaron los extractos combinados sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron. Se usó cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con un gradiente del 0-10% de MeOH en cloruro de metileno para purificar el producto (670 mg, 91%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,59 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,24 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 4,47 (dt, 1H), 4,04 (s, 3H), 3,21 (dd, 1H), 3,10 (dd, 1H), 2,62-2,44 (m, 1H), 2,02-1,86 (m, 1H), 1,81-1,20 (m, 7H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 337,0.

*Etapas 2. (R)-3-Ciclopentil-3-[4-(5-yodo-2-metoxi-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*



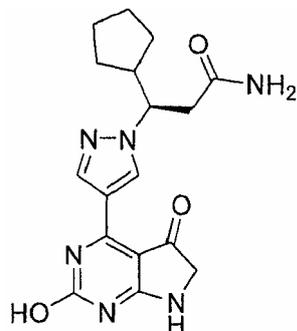
A una disolución de 3-ciclopentil-3-[4-(2-metoxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (0,532 g, 1,58 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml) se le añadió N-yodosuccinimida (0,36 g, 1,6 mmol). Se agitó la reacción durante 30 min. y se eliminó el disolvente a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con un gradiente del 0-65% de acetato de etilo en hexanos proporcionando un sólido de color amarillo (250 mg, 34%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10,31 (s a, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 4,34-4,21 (m, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,14 (dd, 1H), 3,03-2,90 (m, 1H), 2,66-2,49 (m, 1H), 2,02-1,17 (m, 8H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 463,0.

*Etapas 3. Acetato de (R)-4-[1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il]-2-metoxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo*



Se trató una disolución de 3-ciclopentil-3-[4-(5-yodo-2-metoxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (0,25 g, 0,54 mmol) en ácido acético (3 ml) con acetato de plata (0,27 g, 1,6 mmol) y se calentó hasta 70°C durante 16 h. Se filtró la mezcla, se aclaró con MeCN, se añadió agua al filtrado y se agitó esta mezcla durante 20 min. Se añadió cloruro de sodio sólido a esta disolución. Se obtuvo el producto mediante extracción de esta mezcla acuosa con tres partes de acetato de etilo. Se secaron los extractos combinados sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron. Se usó una parte del producto en la etapa de hidrólisis (etapa 4) sin purificación adicional. <sup>1</sup>RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,87 (s a, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 4,22 (dt, 1H), 4,06 (s, 3H), 3,14 (dd, 1H), 2,94 (dd, 1H), 2,64-2,47 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,03-1,86 (m, 1H), 1,79-1,12 (m, 7H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 395,1.

*Etapas 4. (R)-3-Ciclopentil-3-[4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanamida*



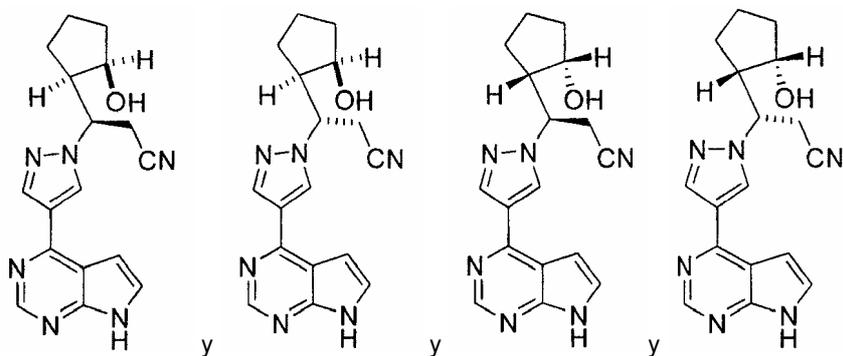
Se añadió 4 M de HBr en ácido acético (2 ml, 8 mmol) a acetato de 4-[1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il]-2-metoxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo (0,050 g, 0,13 mmol) y se agitó la reacción durante 1 h. Se eliminaron a vacío los productos volátiles. Se reconstituyó el residuo y se usó HPLC-EM preparativa (eluyendo con un gradiente de MeCN/H<sub>2</sub>O que contenía el NH<sub>4</sub>OH al 0,15%) proporcionando el producto purificado (12 mg, 26%). <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ 9,20 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 4,49 (dt, 1H), 3,89 (s, 2H), 2,80 (dd, 1

H), 2,64 (dd, 1 H), 2,36-2,26 (m, 1H), 1,83-1,74 (m, 1H), 1,63-1,36 (m, 4H), 1,32-1,20 (m, 2H), 1,15-1,05 (m, 1H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 357,0.

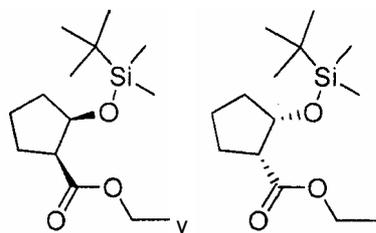
5 *Etapa 5. (R)-3-Ciclopentil-3-[4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

A una disolución de 3-ciclopentil-3-[4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanamida (0,006 g, 0,02 mmol) en cloruro de metileno (0,5 ml) que contenía trietilamina (20 TL, 0,2 mmol) se le añadió cloruro de tricloroacetilo (20 TL, 0,2 mmol). Cuando se completó la reacción, se usó HPLC-EM preparativa (MeCN/H<sub>2</sub>O que contenía NH<sub>4</sub>OH al 0,15%) proporcionando el producto purificado (3 mg, 52%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ 11,39 (s a, 1H), 9,37 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 4,68-4,59 (m, 1H), 3,94 (s, 2H), 3,19-3,15 (m, 2H), 2,42-2,30 (m, 1H), 1,86-1,75 (m, 1H), 1,69-1,20 (m, 6H), 1,18-1,05 (m, 1H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 339,1.

15 Ejemplo 2: (3R) y (3S)-3-[(1R,2R)-2-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y (3R) y (3S)-3-[(1S,2S)-2-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo



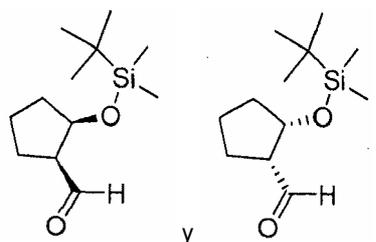
20 *Etapa 1. (1S,2R)-2-(terc-Butildimetilsililoxi)ciclopentanocarboxilato de etilo y (1R,2S)-2-(terc-butildimetilsililoxi)ciclopentanocarboxilato de etilo*



25 A una disolución de cloruro de terc-butildimetilsililo (0,524 g, 3,48 mmol) y 1H-imidazol (0,473 g, 6,95 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 ml) se le añadió cis-2-hidroxi-1-ciclopentanocarboxilato de etilo (racémico, Acros) (0,50 g, 0,0032 mol). Se agitó la reacción durante 16 h. Se añadieron en porciones imidazol (0,40 g, 5,8 mmol) y cloruro de terc-butildimetilsililo (0,50 g, 3,3 mmol) adicionales y se agitó la reacción durante 24 h adicionales. Se extrajo el producto con hexano. Se lavaron los extractos con agua, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron proporcionando hidroxiéster protegido con TBS racémico (0,9 g) que se usó sin purificación adicional.

30 <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,46 (ddd, 1H), 4,19 (dq, 1H), 4,01 (dq, 1H), 2,72 (dt, 1H), 2,22-2,11 (m, 1H), 1,96-1,49 (m, 5H), 1,26 (t, 3H), 0,84 (s, 9H), 0,03 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

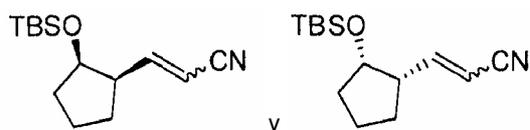
35 *Etapa 2. (1S,2R)-2-(terc-Butildimetilsililoxi)ciclopentanocarbaldehído y (1R,2S)-2-(terc-butildimetilsililoxi)ciclopentanocarbaldehído*



A una disolución de (1S,2R)-2-(terc-butildimetilsililoxi)ciclopentanocarboxilato de etilo y (1R,2S)-2-(terc-butildimetilsililoxi)ciclopentanocarboxilato de etilo de la etapa 1 (0,86 g, 3,2 mmol) en hexanos (40 ml) a -78°C se le

añadió gota a gota una disolución de 1,0 M de hidruro de diisobutilaluminio en tolueno (3,5 ml, 3,5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a  $-78^{\circ}\text{C}$  y se extinguió a esta temperatura mediante la adición gota a gota de metanol (2 ml). Se interrumpió el enfriamiento y se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiental. Se añadió una disolución acuosa de sal de Rochelle. Se agitó vigorosamente la mezcla bifásica durante 2 h y se separaron las fases resultantes. Se extrajo la fase acuosa una vez más con hexanos, luego con tres partes de acetato de etilo. Se lavaron los extractos combinados con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron proporcionando el producto de aldehído racémico, usado sin purificación adicional (0,7 g, 97%).  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9,74 (d, 1H), 4,62 (ddd, 1H), 2,68-2,61 (m, 1H), 2,22-2,11 (m, 1H), 1,95-1,83 (m, 1H), 1,80-1,57 (m, 4H), 0,85 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,04 (s, 3H).

*Etapa 3. (E) y (Z)-3-((1R,2R)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentil)acrilonitrilo y (E) y (Z)-3-((1S,2S)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentil)acrilonitrilo*



A una disolución de (1S,2R)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentanocarbaldehído y (1R,2S)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentanocarbaldehído (0,36 g, 1,6 mmol, de la etapa 2) en tolueno (9 ml) se le añadió (trifenilfosforanilideno)acetonitrilo (0,475 g, 1,58 mmol) y se calentó la reacción hasta  $80^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se añadió agua. Se extrajo el producto con tres partes de etil éter. Se lavaron los extractos con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron proporcionando la mezcla racémica de isómeros de olefinas E y Z que se usó sin purificación adicional.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,82 (dd, 1H, olefina trans), 6,63 (dd, 1H, olefina cis), 5,307 (dd, 1H, olefina trans), 5,305 (dd, 1H, olefina cis), 4,24 (ddd, 1H), 4,20 (ddd, 1H), 2,96-2,86 (m, 1H), 2,53-2,43 (m, 1H), 1,95-1,56 (m, 12H), 0,87 (s, 9H), 0,86 (s, 9H), 0,04-0,01 (singletes, 12H juntos).

*Etapa 4. (3R) y (3S)-3-[(1R, 2R)-2-hidroxíciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y (3R) y (3S)-3-[(1S,2S)-2-hidroxíciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

A una disolución de (E) y (Z)-3-((1R,2R)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentil)acrilonitrilo y (E) y (Z)-3-((1S,2S)-2-(terc-butildimetilsililo)ciclopentil)acrilonitrilo (0,40 g, 1,6 mmol, producto bruto de la etapa 3) en acetonitrilo (20 ml) se le añadió 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (0,50 g, 1,6 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU, 0,24 ml, 1,6 mmol). Se agitó la reacción durante 2 h a temperatura ambiente, y se añadió DBU adicional (0,24 ml, 1,6 mmol). Se agitó la reacción durante 3 días y se concentró. Se usó cromatografía en columna ultrarrápida (eluyendo con un gradiente del 10-40% de acetato de etilo/hexanos) para purificar el producto que luego se trató con TFA al 20% en DCM durante 3 h, se evaporó y se trató con etilendiamina en exceso en una disolución de metanol durante la noche. Cuando se completó la eliminación del grupo protector de SEM, se eliminó cualquier resto de grupo protector de TBS agitando con  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  c. durante 3 horas (razón en volumen de 10:4:3). Se purificaron los productos completamente desprotegidos mediante HPLC-EM preparativa ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,15% en un gradiente de  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ). Se reunieron todas las fracciones de  $M+H=323$  y se evaporaron (aproximadamente 80 mg). Se sometieron los productos a una serie de purificaciones cromatográficas quirales tal como sigue: Chiral Technologies Chiralcel OJ-H (3 x 25 cm, 5 Tm) eluyendo con el 20% de  $\text{EtOH}/\text{el}$  80% de hexanos a una velocidad de flujo de 25 ml/min. proporcionando el pico 1 (19 mg), no se recogió el siguiente pico minoritario; pico 2 (60 mg), pico 3 (6 mg). El pico 2 era una mezcla que luego se separó adicionalmente usando Chiral Technologies Chiralpak IA (2 x 25 cm, 5 Tm) eluyendo con un gradiente del 70% de  $\text{EtOH}/\text{el}$  30% de hexanos a una velocidad de flujo de 8 ml/min. para dar tres componentes. Se marcaron éstos como pico 2-1 (2 ejecuciones, pico 1, 32 mg) que era una mezcla de productos, pico 2-2 (6,5 mg) y pico 2-3 (13,7 mg). Se separó adicionalmente el pico 2-1 en tres componentes usando Chiral Technologies Chiralpak IA (2 x 25 cm, 5 Tm) eluyendo con un gradiente del 25% de  $\text{EtOH}/\text{el}$  75% de hexanos a una velocidad de flujo de 12 ml/min. Se marcaron los productos aislados como pico 2-1-1 (10,5 mg); 2-1-2 (13 mg); y 2-1-3 (2,3 mg).

Pico 1:  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,65 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,49 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 4,71 (ddd, 1H), 4,28 (t a, 1H), 3,26 (dd, 1H), 3,21 (dd, 1H), 2,53-2,45 (m, 1H), 1,98-1,73 (m, 3H), 1,62-1,47 (m, 2H), 1,38-1,29 (m, 1H); CL-EM ( $M+H$ ) $^+$ : 323.

Pico 2-1-1:  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,64 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,49 (d, 1H), 6,94 (d, 1H), 4,90-4,78 (m, 1H), 3,64 (t a, 1H), 3,21 (dd, 1H), 3,07 (dd, 1H), 2,55-2,40 (m, 1H), 2,01-1,58 (m, 6H); CL-EM ( $M+H$ ) $^+$ : 323.

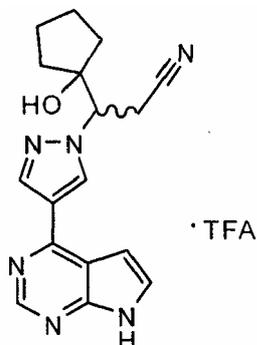
Pico 2-1-2:  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,65 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,49 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 4,71 (ddd, 1H), 4,28 (t a, 1H), 3,26 (dd, 1H), 3,21 (dd, 1H), 2,53-2,45 (m, 1H), 1,98-1,73 (m, 3H), 1,62-1,48 (m, 2H), 1,38-1,26 (m, 1H); CL-EM ( $M+H$ ) $^+$ : 323.

Pico 2-3:  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8,64 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,48 (d, 1H), 6,93 (d, 1H), 4,90-4,78

(m, 1H), 3,64 (t a, 1H), 3,21 (dd, 1H), 3,07 (dd, 1 H), 2,55-2,40 (m, 1H), 2,01-1,58 (m, 6H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 323.

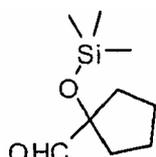
**Ejemplo 3:** Sal de trifluoroacetato de 3-(1-hidrox ciclopentil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo racémico

5



**Etapa 1.** 1-[(Trimetilsilil)oxi]ciclopentanocarbaldehído

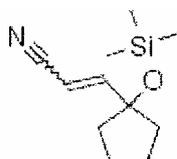
10



Se llevó a cabo la reacción en un procedimiento similar al descrito en Tetrahedron, 50(9), 2821-30; 1994: A una disolución de 1-[(trimetilsilil)oxi]ciclopentanocarbonitrilo (2,25 g, 12,3 mmol, preparado tal como se describe en Organometallics, 3(11), 1660-5; 1984) en tolueno (18 ml) a -45°C se le añadió gota a gota 1,0 M de hidruro de diisobutilaluminio en hexano (17,2 ml, 17,2 mmol). Entonces se dejó que la disolución se calentara hasta 0°C y se agitó durante 1 h a esta temperatura. Se vertió la mezcla de reacción en una mezcla de dietil éter (25 ml) y cloruro de amonio (25 ml, saturado). A la mezcla resultante, a 15°C, se le añadió una disolución diluida de ácido sulfúrico (preparada diluyendo 1,53 ml de N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado con 50 ml de agua). Entonces se agitó la disolución a una temperatura de 5°C durante la noche. Se extrajo la mezcla con tres partes de dietil éter, se lavaron los extractos combinados con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron proporcionando el producto (0,84 g, 36%), que se usó sin purificación adicional en la etapa 2. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,47 (s, 1 H), 1,88-1,46 (m, 8H), 0,00 (s, 9H).

**Etapa 2.** (2E) y (2Z)-3-{1-[(trimetilsilil)oxi]ciclopentil}acrilonitrilo

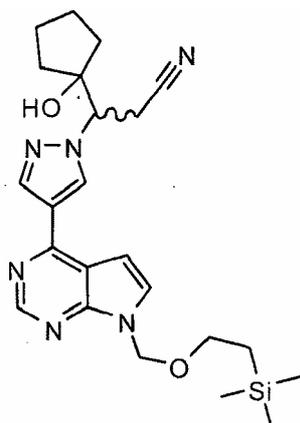
25



Se añadió gota a gota cianometilfosfonato de dietilo (0,912 ml, 5,64 mmol) a una suspensión de hidruro de sodio (0,198 g, 4,96 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0°C. Tras la adición, se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 45 minutos. Se volvió a enfriar la mezcla hasta 0°C y se introdujo 1-[(trimetilsilil)oxi]ciclopentanocarbaldehído (0,84 g, 4,5 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml). Se dejó que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se añadieron agua y acetato de etilo a la reacción y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con dos partes adicionales de acetato de etilo. Se lavaron los extractos orgánicos combinados con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se decantaron y se concentraron proporcionando el producto como una mezcla de isómeros de olefina, usada sin purificación adicional en la etapa 3. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,80 (d, 1H, trans/producto principal), 6,53 (d, 1H, cis/producto minoritario), 5,52 (d, 1H, trans), 5,28 (d, 1H, cis), 2,06-0,76 (m, 16H total para ambos isómeros), 0,18 (s, 9H, producto minoritario), 0,13 (s, 9H, producto principal).

**Etapa 3.** 3-(1-Hidroxiciclopentil)-3-(4-(7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo racémico

40



5 A una suspensión de (2E) y (2Z)-3-{1-[(trimetilsilil)oxi]ciclopentil}acrilonitrilo (0,94 g, 4,5 mmol) y 4-(1H-pirazol-4-il)-7-  
 10 {[2-(trimetilsilil)etoxi]metil}-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (1,4 g, 4,5 mmol) en acetonitrilo (20 ml) se le añadió 1,8-  
 diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0,67 ml, 4,5 mmol). Se dejó que la reacción se agitara a temperatura ambiente  
 durante 6 días. Se evaporó el acetonitrilo. Se aisló el producto de alcohol no protegido deseado de la mezcla de  
 alcohol no protegido y productos de alcohol protegidos con TMS usando cromatografía en columna ultrarrápida,  
 eluyendo con un gradiente del 0-80% de acetato de etilo en hexanos (890 mg, 44%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ  
 8,87 (s, 1 H), 8,56 (s a, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,46 (d, 1H), 6,84 (d, 1H), 5,69 (s, 2H), 4,40 (dd, 1H), 4,03 (s, 1H), 3,55  
 (dd, 2H), 3,46 (dd, 1H), 2,97 (dd, 1H), 2,04-1,27 (m, 8H), 0,93 (dd, 2H), -0,05 (s, 9H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 453,1.

*Etapa 4. Sal de trifluoroacetato de 3-(1-hidroxiciclopentil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

15 Se agitó una disolución de 3-(1-hidroxiciclopentil)-3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-  
 pirazol-1-il]propanonitrilo racémico (0,100 g, 0,221 mmol) en cloruro de metileno (4 ml) y ácido trifluoroacético (1 ml)  
 durante 2 horas y se evaporaron los disolventes. Se agitó el residuo con etilendiamina (0,1 ml, 2 mmol) en metanol  
 (4,5 ml) durante 1 hora y se evaporó. Se reconstituyó el producto bruto en metanol y se purificó mediante dos etapas  
 20 cromatográficas sucesivas usando HPLC-EM preparativa (eluyendo con un gradiente de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O que  
 contenía NH<sub>4</sub>OH al 0,15% para la primera ejecución, seguido por un gradiente de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O que contenía TFA  
 al 0,1% para la segunda ejecución) proporcionando el producto racémico como la sal de trifluoroacetato. <sup>1</sup>H-RMN  
 (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ 12,72 (s a, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 4,80 (dd,  
 1H), 3,51 (dd, 1H), 3,22 (dd, 1H), 1,79-1,42 (m, 7H), 1,25-1,15 (m, 1H); CL-EM (M+H)<sup>+</sup>: 323,1.

25 Ejemplo A

Se aislaron los metabolitos 1-39 de orina, plasma o heces de ser humano, rata o perro tras la administración del  
 compuesto I en relación con estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos. Se determinó la identidad de los  
 30 metabolitos tras el aislamiento del metabolito usando métodos de HPLC. El método usado y los tiempos de retención  
 correspondientes de los metabolitos se presentan en la tabla 2. Se realizaron análisis de EM/EM en tándem y  
 experimentos de EM<sup>n</sup> de orden superior tal como se requiere para dilucidar la información estructural.

El compuesto I demuestra un ión molecular protonado a m/z 307, y un espectro iónico de producto que muestra  
 35 señales a m/z 266, 186 y 159. El ión fragmento a m/z 266 concuerda con la pérdida del resto carbonitrilo. El ión  
 fragmento de diagnóstico a m/z 186 es indicativo de la pérdida del resto ciclopentilpropanonitrilo intacto. El ión  
 fragmento a m/z 159 indica la pérdida del ciclopentilpropanonitrilo conjuntamente con la escisión a través del anillo  
 de pirazol del compuesto I.

Se observaron los compuestos de metabolitos 1, 2, 27 y 29 principalmente en orina de sujetos humanos, con niveles  
 40 traza de compuestos 27 y 29 observados en plasma. La espectrometría de masas de exploración completa  
 demostró un ión molecular protonado a m/z 339, que concuerda con la bis-hidroxilación del compuesto I. La  
 fragmentación iónica de producto de estos iones m/z 339 produce espectros prácticamente idénticos para estos  
 metabolitos, con iones observados a m/z 321, 186, 159 y 154. El ión a m/z 321 concuerda con una pérdida de agua  
 y sugiere que puede haber al menos una hidroxilación en el anillo de ciclopentilo. Los iones a m/z 186 y m/z 159  
 45 concuerdan con una pirazol-pirrolpirimidina intacta. El ión a m/z 154 concuerda con una pérdida neutra de todo el  
 resto pirazol/pirrolpirimidina no modificado. Iones fragmento minoritarios a m/z 298 y m/z 280 sugieren la pérdida  
 de los elementos de acetonitrilo, con y sin pérdida de agua superficial, que restringe adicionalmente la ubicación de  
 las hidroxilaciones al resto ciclopentilo. Esto está apoyado adicionalmente por el ión a m/z 237, que concuerda con  
 la pérdida del ciclopentilo modificado, dejando el resto de la molécula sin modificar.

50 Se encontró el compuesto 31 en la orina de sujetos humanos. La espectrometría de masas de exploración completa

demostró un ión molecular protonado a  $m/z$  339, que concuerda con la adición de 32 uma al compuesto I. La fragmentación iónica de producto del ión  $m/z$  339 produce iones fragmento a  $m/z$  311, 218 y 191. El fragmento primario a  $m/z$  218 que concuerda con la adición de 32 uma al resto pirazol-pirrolopirimidina. El ión fragmento a  $m/z$  191 concuerda con una pérdida de CHN del resto pirazol de la supuesta pirazol-pirrolopirimidina bis-hidroxilada, que restringe la ubicación de la(s) modificación/modificaciones a la pirrolopirimidina. El ión fragmento a  $m/z$  311 surge probablemente de la escisión inicial del enlace amida, seguido por la pérdida de CO de la pirrolidinona. La asignación estructural del compuesto 31 usando espectrometría de masas sola condujo a un resultado ambiguo, por tanto se aisló el compuesto 31 de orina humana y se analizó mediante  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN. Se identificó la estructura de 31 como un metabolito de amida-alcohol del resto pirrolopirimidina saturado del compuesto I. El espectro de RMN de protón de 31 tiene un singlete a  $\delta$  3,56 con una intensidad de 2H. Este singlete tiene una correlación de intervalo largo con un carbono a  $\delta$  177,9, que concuerda con una amida. Además, se produce una potenciación de Overhauser nuclear (nOe) entre H3 y H9.

Se encontró el compuesto 32 en plasma y orina de sujetos humanos. La espectroscopía de masas de exploración completa demostró un ión molecular protonado a  $m/z$  339, que concuerda con la adición de 32 uma al compuesto I. La fragmentación iónica de producto del ión  $m/z$  339 produce iones fragmento a  $m/z$  218 y 191. El fragmento primario a  $m/z$  218 que concuerda con la adición de 32 uma al resto pirazol-pirrolopirimidina. El ión fragmento a  $m/z$  191 concuerda con una pérdida de CHN del resto pirazol de la supuesta pirazol-pirrolopirimidina bis-hidroxilada, que restringe la ubicación de la(s) modificación/modificaciones a la pirrolopirimidina. La asignación estructural del compuesto 32 usando espectroscopía de masas sola condujo a un resultado ambiguo, por tanto se aisló el compuesto 32 de orina humana y se analizó mediante  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN. Se identifica la estructura del compuesto 32 como un metabolito de ceto-alcohol del resto pirrolopirimidina saturado del compuesto I. El espectro de RMN de protón de 32 tiene un singlete a  $\delta$  3,82 que tiene una intensidad de 2H y muestra una correlación de intervalo largo con un carbono a  $\delta$  191,5, que concuerda con una cetona. No se observó potenciación de Overhauser nuclear (nOe) a partir de H2 con cualquier otro protón.

Se observó el compuesto 40 en plasma y orina de sujetos humanos. La espectroscopía de masas de exploración completa demostró un ión molecular protonado a  $m/z$  341, que concuerda con la adición de 34 uma al compuesto I. La fragmentación iónica de producto del ión  $m/z$  341 produce iones fragmento a  $m/z$  323, 220, 202 y 175. El ión fragmento a  $m/z$  323 surge de la pérdida de agua del pirrolidindiol. Los iones fragmento a  $m/z$  220 y 202 concuerdan con una pirrolopirimidina saturada doblemente hidroxilada, con y sin la pérdida de agua superficial observada. El ión observado a  $m/z$  175 concuerda con la pérdida de CHN del resto pirazol de la pirazol-pirrolopirimidina saturada doblemente hidroxilada tras la pérdida de agua superficial. El compuesto 40 se identifica como 3-ciclopentil-3-(-(5,6-dihidroxi-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo.

Se observaron conjugados de metabolitos hidroxilados sólo una vez del compuesto I que tenían un  $m/z$  observado de 499 en orina de ser humano, observándose también dos de los siete conjugados en cantidades traza en plasma humano. La fragmentación iónica de producto inicial produce espectros prácticamente idénticos para seis de estos metabolitos, con un ión observado a  $m/z$  323, que concuerda con la pérdida del conjugado de glucurónido. La fragmentación iónica de producto ( $\text{EM}^3$ ) de estos iones fragmento  $m/z$  323 demostró de nuevo espectros de masas prácticamente idénticos, con iones fragmento a  $m/z$  305, 186 y 159. El ión fragmento encontrado a  $m/z$  305 concuerda con una pérdida de agua (18 uma), sugiriendo que la hidroxilación y posterior colisión indujo fragmentación en una parte saturada de la molécula, que restringe el sitio de modificación al resto ciclopentilo. Los iones fragmento a  $m/z$  186 y  $m/z$  159 concuerdan con una pirazol-pirrolopirimidina no modificada. Iones fragmento minoritarios adicionales eran demasiado débiles como para asignarlos con alguna certeza. Se confirmó la identidad de estos supuestos metabolitos mediante hidrólisis de los conjugados de glucurónido aislados con  $\beta$ -glucuronidasa para revelar la aglicona, que entonces se sometió a análisis mediante HPLC-EM en el que los tiempos de retención y los espectros de masas de las agliconas liberadas coincidían con los de patrones de metabolitos hidroxilados sólo una vez. Las agliconas de estos metabolitos de conjugados de glucurónido corresponden a metabolitos de 2-hidroxilo (metabolito 9, tabla 1) y metabolitos de 3-hidroxilo (metabolito 8, tabla 1). La aglicona del séptimo metabolito de conjugado de glucurónido, el compuesto 42, corresponde a un metabolito hidroxilado sólo una vez del resto pirazol-pirrolopirimidina del compuesto I, que no se observó independientemente en plasma u orina de sujetos humanos. La espectroscopía de masas de exploración completa demostró un ión molecular protonado a  $m/z$  323, que concuerda con la adición de 16 uma al compuesto I. La fragmentación iónica de producto del ión  $m/z$  323 produce un fragmento primario a  $m/z$  202 que concuerda con la adición de 16 uma al resto pirazol-pirrolopirimidina. El ión fragmento a  $m/z$  175 concuerda con una pérdida de CHN del resto pirazol de la supuesta pirazol-pirrolopirimidina hidroxilada, que restringe la ubicación de la modificación a la pirrolopirimidina. La estructura del metabolito compuesto 42 se identifica como un conjugado de glucurónido con un resto pirrolopirimidina hidroxilada sólo una vez del compuesto I.

El encontró el metabolito compuesto 41 en orina de sujetos humanos. La espectroscopía de masas de exploración completa indicó un ión molecular protonado a  $m/z$  583, que concuerda con la conjugación con glucurónido de compuesto I no modificado. La fragmentación iónica de producto del ión  $m/z$  583 produce un fragmento primario a  $m/z$  307 que concuerda con la pérdida de un glucurónido intacto. Iones fragmento minoritarios a  $m/z$  186 y  $m/z$  159 concuerdan con los observados para el compuesto I. La fragmentación  $\text{EM}^3$  del ión fragmento  $m/z$  307 también

reveló iones fragmento a m/z 186 y m/z 159. El compuesto 41 se identifica como un conjugado de glucurónido unido a N del compuesto I.

Tabla 2

| Compuesto | m/z | Método de análisis | Tiempo de Retención (min.) | Descripción del metabolito   |
|-----------|-----|--------------------|----------------------------|--|
| 1         | 339 | A4                 | 4,3                        | Di-hidroxilación de resto ciclopentilo   |
| 2         | 339 | A4                 | 4,8                        | Di-hidroxilación de resto ciclopentilo   |
| 3         | 499 | A3                 | 4,8                        | Ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentilo)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico |
| 4         | 499 | A3                 | 5,3                        | O-glucuronidación de resto ciclopentilo  |
| 5         | 499 | A3                 | 5,8                        | O-glucuronidación de resto ciclopentilo  |
| 6         | 339 | A4                 | 5,9                        | Dihidroxilación  |
| 7         | 499 | A3                 | 6,3                        | O-glucuronidación de resto ciclopentilo  |
| 8         | 499 | A3                 | 6,8                        | Ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentilo)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico |
| 9         | 339 | A4                 | 8,1                        | Hidroxilación en restos ciclopentilo y pirazol o pirrolopirimidina   |
| 10        | 339 | A4                 | 8,4                        | Hidroxilación en restos ciclopentilo y pirazol o pirrolopirimidina   |
| 11        | 355 | A1                 | 8,5                        | Tri-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 12        | 355 | A1                 | 14,6                       | Tri-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 13        | 499 | A1/A3              | 15,3                       | O-glucuronidación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 14        | 499 | A1/A3              | 18,6                       | O-glucuronidación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 15        | 499 | A1/A3              | 25,3                       | O-glucuronidación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 16        | 321 | A1/A3              | 26,5                       | Cetona sobre resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 17        | 339 | A1                 | 28                         | Hidroxilación en restos ciclopentilpropanonitrilo y pirrolidina  |
| 18        | 323 | A1/A3              | 35                         | Hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 19        | 499 | A1/A3              | 42,2                       | O-glucuronidación de resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 20        | 355 | A1                 | 44,2                       | Di-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo e hidroxilación de resto pirrolidina   |
| 21        | 355 | A1                 | 51,4                       | Di-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo e hidroxilación de resto pirrolidina   |
| 22        | 339 | A1                 | 52,2                       | Hidroxilación en restos ciclopentilpropanonitrilo y pirrolidina  |
| 23        | 339 | A1                 | 55,8                       | Hidroxilación en restos ciclopentilpropanonitrilo y pirrolidina  |
| 24        | 355 | A1                 | 4,7                        | Dihidroxilación en resto ciclopentilpropanonitrilo e hidroxilación de resto pirrolidina  |
| 25        | 339 | A1                 | 7,7                        | Di-hidroxilación en resto ciclopentilpropanonitrilo  |
| 26        | 339 | A1                 | 8,4                        | Di-hidroxilación en resto ciclopentilpropanonitrilo  |
| 27        | 339 | A1                 | 11,9                       | Di-hidroxilación en resto ciclopentilpropanonitrilo  |
| 28        | 323 | A1/A3              | 12,4                       | Hidroxilación en resto ciclopentilpropanonitrilo   |
| 29        | 339 | A1                 | 12,7                       | Di-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo  |
| 30        | 515 | A3                 | 9,6                        | Di-hidroxilación de resto ciclopentilpropanonitrilo y O-glucuronidación  |
| 31        | 339 | A3                 | 27                         | 3-Ciclopentil-3-(4-(2,6-dioxo-3,5,6,7-tetrahydro-2H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo                                |

|    |     |       |      |   |
|----|-----|-------|------|---|
| 32 | 339 | A3    | 29   | 3-Ciclopentil-3-(4-(2-hidroxi-5-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo                               |
| 33 | 323 | A1    | 55,8 | Hidroxilación de resto pirrolopirimidina  |
| 34 | 499 | A1/A3 | 37,5 | O-glucuronidación de resto ciclopentilpropanonitrilo  |
| 35 | 339 | A6    | 5,1  | 3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1,2-dihidroxiciclopentil)propanonitrilo  |
| 36 | 323 | -     | -    | 3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil) propanonitrilo   |
| 37 | 323 | A6    | 8,1  | 3-Ciclopentil-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo   |
| 38 | 339 | A6    | 5,4  | 3-(3-Hidroxiciclopentil)-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo                              |
| 39 | 371 | A3    | 17,7 | Hidroxilación de cuadrupolo   |
| 40 | 341 | A7    | 27,7 | 3-Ciclopentil-3-(4-(5,6-dihidroxi-6,7-dihidro-5H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo                                 |
| 41 | 483 | A7    | 36,0 | Ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-7-il)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico |
| 42 | 499 | A7    | 37,7 | Hidroxilación de resto pirrolopirimidina y O-glucuronidación  |

MÉTODO A1: Biotransformación de <sup>14</sup>C-compuesto I en muestras de plasma, orina y fecales de ser humano, perro y ratón

5 *Preparación de las muestras para la obtención del perfil de metabolitos:*

*Plasma:*

10 Se reunieron muestras de plasma de todos los sujetos por sujeto y/o por punto de tiempo. Se prepararon las muestras de plasma reunidas para el análisis de HPLC-radiométrico tal como sigue: Se extrajeron inicialmente alícuotas de las muestras de plasma reunidas con aproximadamente dos volúmenes equivalentes (P/V) de ácido fórmico al 1% en acetonitrilo de calidad para HPLC, seguido por agitación con vórtex vigorosa, y centrifugación para eliminar las proteínas plasmáticas desnaturalizadas. Se reservó el sobrenadante y se hizo pasar a través de un cartucho de extracción de fase sólida Waters C-18 preacondicionado, y se retuvo el filtrado. Se retuvo el cartucho SPE. Entonces se extrajo el sedimento de plasma restante tres veces con ácido fórmico al 1% en acetonitrilo/agua (90/10) de calidad para HPLC, con centrifugación tras cada extracción. Se reservaron todos los sobrenadantes. Se usó cada sobrenadante de extracción de ácido fórmico/acetonitrilo/agua para eluir el cartucho SPE. Entonces se enjuagó el cartucho SPE con ácido fórmico al 1% en metanol. Se retuvieron todos los eluyentes, se combinaron y se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno a 30°C. Se reconstituyó el resto de esta extracción en aproximadamente 20 0,6 ml de ácido fórmico al 0,1% en agua, se agitó con vórtex y se centrifugó para eliminar la materia particulada. Entonces se analizó el sobrenadante mediante HPLC-radiometría de flujo y HPLC-EM.

*Orina:*

25 Se reunieron alícuotas de cantidades aproximadamente iguales de orina de cada uno de los sujetos para representar intervalos de tiempo apropiados tras la dosis. Antes del análisis de HPLC-radiométrico, se centrifugó cada muestra de orina reunida a 4.000 rpm durante 10 min. para eliminar la materia particulada, luego se analizó directamente.

30 *Heces:*

Se reunieron alícuotas de homogeneizados de heces de cada sujeto para representar intervalos de tiempo apropiados tras la dosis. Se prepararon las muestras de homogeneizados de heces reunidas para el análisis de HPLC-radiométrico tal como sigue:

35 Se extrajeron inicialmente alícuotas de aproximadamente 5 gramos de homogeneizado fecal con aproximadamente dos volúmenes equivalentes (P/V) de agua Millipore, seguido por centrifugación para eliminar los sólidos. Se reservó el sobrenadante y se hizo pasar a través de un cartucho de extracción de fase sólida Waters C-18 preacondicionado. Se retuvo el cartucho SPE. Entonces se extrajo el sedimento fecal restante tres veces con ácido fórmico al 1% en acetonitrilo/agua (90/10) de calidad para HPLC, con centrifugación tras cada extracción. Se reservaron todos los

40

sobrenadantes. Se usó cada sobrenadante de extracción de ácido fórmico/acetonitrilo/agua para eluir el cartucho SPE. Se retuvieron todos los eluyentes, se combinaron y se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno a 30°C. Se reconstituyó el resto de esta extracción en aproximadamente 2,0 ml de ácido fórmico al 0,1% en agua, se agitó con vórtex y se centrifugó para eliminar la materia particulada. Entonces se analizó el sobrenadante mediante HPLC-radiometría de flujo y HPLC-EM.

Método analítico de HPLC-radiometría de flujo:

Se analizaron todas las muestras mediante o bien HPLC-radiometría de flujo o bien HPLC-EM usando sistemas analíticos que eran tan idénticos como pudiese ponerse en práctica. El sistema de HPLC-radiometría de flujo consistía en una bomba cuaternaria serie HP1100 de Agilent, un inyector automático y un detector UV interconectado con un detector de centelleo de flujo Raytest Ramona-90 con una célula de centelleo líquido de 500 µl. Se logró la separación del compuesto I y sus metabolitos con una columna de HPLC Waters Symmetry C-18, 4,6 x 250 mm, columna de HPLC de tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil "A" consistía en ácido fórmico al 0,1% en agua de calidad para HPLC, consistiendo la fase móvil "B" en metanol/acetonitrilo (1:1) de calidad para HPLC. Se logró la elución de los analitos a través del uso de un gradiente creciente lineal de fase móvil "B". Se emplearon dos métodos de elución en gradiente diferentes a diversos tiempos según fuese necesario. Se explican resumidamente a continuación las condiciones cromatográficas para estos dos métodos en las tablas 3 y 4.

Método analítico de HPLC-espectroscopía de masas:

El sistema de HPLC-radiometría de flujo consistía en una bomba cuaternaria serie HP1100 de Agilent, e inyector automático CTC-PAL de Leap Technologies interconectado con un instrumento API 4000 Qtrap de Applied Biosystems que funcionaba en el modo de detección de ión positivo. Se emplearon exploración completa (EM) y exploraciones de ión producto dependiente de los datos (EM<sup>2</sup>) en la caracterización de los metabolitos del compuesto I. También se usaron transiciones de MRM seleccionadas para explorar e identificar metabolitos identificados y caracterizados previamente. Se logró la separación del compuesto I y sus metabolitos con una columna de HPLC Waters Symmetry C-18, 4,6 x 250 mm, columna de HPLC de tamaño de partícula de 5 µm. La fase móvil "A" consistía en ácido fórmico al 0,1% en agua de calidad para HPLC, consistiendo la fase móvil "B" en metanol/acetonitrilo (1:1) de calidad para HPLC. Se logró la elución de los analitos a través del uso de un gradiente creciente lineal de fase móvil "B". Se emplearon dos métodos de elución en gradiente diferentes a diversos tiempos según fuese necesario. Se explican resumidamente a continuación las condiciones cromatográficas para estos dos métodos en las tablas 3 y 4.

Tabla 3

| Condiciones cromatográficas |        |                 |
|-----------------------------|--------|-----------------|
| Tiempo (min.)               | % de B | Flujo (µl/min.) |
| 0,0                         | 10     | 1000            |
| 45,0                        | 20     | 1000            |
| 50,0                        | 50     | 1000            |
| 55,0                        | 90     | 1000            |
| 57,0                        | 90     | 1000            |
| 57,1                        | 10     | 1000            |
| 65,0                        | 10     | 1000            |

Tabla 4

| Condiciones cromatográficas |        |                 |
|-----------------------------|--------|-----------------|
| Tiempo (min.)               | % de B | Flujo (µl/min.) |
| 0,0                         | 10     | 1000            |
| 45,0                        | 20     | 1000            |
| 90,0                        | 40     | 1000            |
| 92,0                        | 90     | 1000            |
| 97,0                        | 90     | 1000            |
| 97,1                        | 10     | 1000            |
| 102,0                       | 10     | 1000            |

**MÉTODO A2: Biotransformación del compuesto I: Aislamiento de metabolitos de orina humana:**

5 Se usó extracción de fase sólida usando cartuchos HLB SPE de Waters de 20 cc (1 gramo de sorbente) para concentrar metabolitos del compuesto I a partir de muestras de orina reunidas. Se acondicionaron los cartuchos en primer lugar con un 100% de metanol de calidad para HPLC, luego con agua Millipore. Entonces se cargó inmediatamente el cartucho con hasta 10 ml de orina sin procesar de partida. Se eluyó secuencialmente el cartucho usando varias concentraciones de metanol de calidad para HPLC en agua (tabla 5).

10

Tabla 5

| Operación         | Composición de disolvente | Volumen |
|-------------------|---------------------------|---------|
| Acondicionamiento | 100% de metanol           | 10 ml   |
| Acondicionamiento | 100% de agua Millipore    | 10 ml   |
| Carga             | Orina                     | 7-10 ml |
| Elución           | 5% de metanol en agua     | 10 ml   |
| Elución           | 25% de metanol en agua    | 10 ml   |
| Elución           | 50% de metanol en agua    | 10 ml   |
| Elución           | 75% de metanol en agua    | 10 ml   |
| Elución           | 100% de metanol en agua   | 10 ml   |

15

Se analizaron alícuotas de la orina inicial, el volumen de última carga y cada volumen de lavado/elución mediante LC-EM para detectar la presencia de compuesto I y metabolitos de interés. No había cantidades significativas de o bien compuesto I, o bien sus metabolitos en ninguno de los volúmenes de carga, o lavados/eluciones hasta el 25% de metanol en agua Millipore. No se encontraron cantidades significativas de fármaco o metabolitos en las alícuotas de elución con el 100% de metanol. Se redujeron en volumen cada uno de los volúmenes de elución de las eluciones con el 50% y el 75% de metanol usando el evaporador centrífugo Genevac y se reconstituyeron hasta un volumen final de ~2 ml antes de inyectarse en serie sobre la CL-EM para la recogida de fracciones de los metabolitos de interés.

20

*Condiciones analíticas:*

25

Se analizaron las muestras mediante CL-EM usando un instrumento Finnigan LCQ Deca XP Plus interconectado con uno bloque de HPLC binario Shimadzu que consiste en un inyector automático Sil-HTC y un controlador de sistema, y dos bombas de CL de alta presión Sil 10ADVP. Se hizo funcionar el espectrómetro de masas en el modo de detección de ión positivo, usando exploración dependiente de datos para producir datos de EM<sup>2</sup> dependientes de datos y EM. Se usó un detector UV Shimadzu, Sil SPD10 AVp a una longitud de onda de detección de 254 nm para monitorizar el eluyente de HPLC conjuntamente con el espectrómetro de masas.

30

35

La fase móvil "A" consistía en formiato de amonio 5 mM con pH ajustado a pH 3,2 con ácido fórmico (aproximadamente el 0,1% en volumen). La fase móvil "B" consistía en el 90% de acetonitrilo / el 10% de metanol. La columna de HPLC usada era una Zobax XDB C-18, 3,0 mm x 150 mm, tamaño de partícula de 5,0 Tm. La elución del analito fue a través del uso de un gradiente creciente lineal de fase móvil "B". Se explican resumidamente las condiciones cromatográficas para el análisis a escala analítica en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

| Condiciones cromatográficas |                  |                 |
|-----------------------------|------------------|-----------------|
| Tiempo (min.)               | % de B (Tl/min.) | Flujo (Tl/min.) |
| 0,0                         | 10               | 300             |
| 1,0                         | 10               | 300             |
| 45,0                        | 40               | 300             |
| 50,0                        | 90               | 300             |
| 54,0                        | 90               | 300             |
| 54,1                        | 10               | 300             |
| 60,0                        | 10               | 300             |

*Condiciones analíticas semipreparativas:*

5 Se analizaron muestras mediante CL-EM como anteriormente con los siguientes cambios: La columna de HPLC usada era una Fenomenex Polar RP 10 mm x 150 mm de tamaño de partícula de 5 Tm.

10 Se llevó a cabo el fraccionamiento inicial usando acetato de amonio neutro como fase "A", con una segunda etapa de limpieza de picos recogidos individuales llevada a cabo usando ácido fórmico al 0,025% en agua como fase "A". La fase móvil "B" consistía en el 90% de acetonitrilo / el 10% de metanol.

15 La elución inicial de analitos y la recogida de fracciones automatizada fueron a través del uso de un gradiente creciente lineal de fase móvil "B". Se explican resumidamente las condiciones cromatográficas para el análisis semipreparativo en la tabla 7 a continuación, pero se optimizó el % de B según fuese necesario para cada metabolito individual en la segunda etapa de limpieza.

Tabla 7

| Condiciones cromatográficas semipreparativas |        |                 |
|--|--------|-----------------|
| Tiempo (min.)                                | % de B | Flujo (ml/min.) |
| 0,0  | 7      | 1,75            |
| 1,0  | 25*    | 1,75            |
| 24,0   | 35*    | 1,75            |
| 24,1   | 90     | 1,75            |
| 28,0   | 90     | 1,75            |
| 28,1   | 7      | 1,75            |
| 35,0   | 7      | 1,75            |

\*Optimizado para cada metabolito individual en la segunda etapa de fraccionamiento

20 Se dividió la corriente de eluyente de los análisis semipreparativos usando tubos y uniones en T PEEK, utilizándose una anchura de ~1,65 ml/min. de la corriente de eluyente para la recogida de fracciones y pasando el resto al espectrómetro de masas. Se monitorizó la composición de la corriente de eluyente mediante EM y experimentos de EM-EM seleccionados. Se recogieron automáticamente las fracciones que contenían el analito de interés utilizando la válvula de desviación conjuntamente con un colector de fracciones.

### 25 MÉTODO A3: Biotransformación del compuesto I en muestras de plasma y orina de ser humano y rata

*Preparación de las muestras:*

30 Se obtuvieron muestras de plasma y orina de sujetos animales y humanos a los que se les había dosificado por vía oral el compuesto I siguiendo estudios de una única dosis y/o múltiples dosis. Se reunieron muestras de plasma residuales para cada sujeto mediante reunión de tiempo promedio ponderado. Se precipitaron alícuotas de las muestras de plasma reunidas (150 µl) con dos volúmenes de acetonitrilo, se mezclaron con vórtex y entonces se centrifugaron. Se separaron los sobrenadantes y se usaron para el análisis mediante CL-EM. Para ser humano, se reunieron las muestras de orina de cada individuo en el estudio para que representasen 0-12 horas en el día 1 (estudio de una única dosis) y el día 10 (estudio de múltiples dosis) del estudio clínico. Se centrifugaron las muestras de orina a ~15000 x g durante 10 minutos antes del análisis y se inyectaron directamente.

*Análisis de muestras:*

40 Se sometieron a ensayo las muestras usando CL-EM de ionización por electrospray con un espectrómetro de masas de trampa iónica Thermo Finnigan LCQ Deca-XP Plus (Thermo-Fisher Scientific Waltham MA, EE.UU.), que funcionaba en el modo de ionización positivo. Se usó exploración dependiente de datos para generar datos de EM con respecto a EM<sup>2</sup> iniciales. Se realizaron experimentos de EM<sup>n</sup> de orden superior según se requiriera para dilucidar la información estructural. Se acopló el espectrómetro de masas a un inyector automático/controlador combinado Shimadzu Sil HT-C combinado con un sistema de bomba de gradiente binaria Shimadzu LC-10A (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EE.UU.). Se describen las condiciones de gradiente en la tabla 8.

45 Se logró la separación del compuesto I y sus metabolitos usando una columna de HPLC Zorbax XDB C-18 (3,0 x 150 mm, 3,5 µm) (Agilent, Santa Clara, CA EE.UU.) con una velocidad de flujo de fase móvil de 300 µl/min. La fase móvil "A" consistía en formiato de amonio 5 mM en agua Millipore con pH ajustado a pH 3,2 con ácido fórmico. La fase móvil "B" consistía en el 90% de acetonitrilo / el 10% de metanol.

50

Tabla 8. Esquema de la elución en gradiente de la HPLC

| Tiempo | % de fase móvil B |
|--------|-------------------|
| 0,0    | 10                |
| 1,0    | 10                |
| 45,0   | 40                |
| 50,0   | 90                |
| 54,0   | 90                |
| 54,1   | 10                |
| 60,0   | 10                |

**MÉTODO A4: Método para la caracterización de metabolitos de bilis, plasma y orina de rata**

- 5 Se reunieron muestras de orina, heces y bilis de ratas a las que se les administró el compuesto I. Se reunió aproximadamente el 30% de cada muestra a partir de cada punto de tiempo de manera que el 90% de la dosis excretada a partir de una rata estaba contenido en una única muestra. Se analizaron por separado las muestras de cada rata. Se extrajeron muestras de heces usando acetonitrilo y recuperación de la extracción determinada mediante recuento de centelleo líquido (LSC) del extracto y combustión y LSC del sedimento no extraído. Cuando
- 10 estaban disponibles, se usaron patrones de metabolitos para confirmar las estructuras. No se notificaron picos que representaban < 5% de la dosis administrada a menos que se indique lo contrario.

Se analizaron muestras de orina, heces, bilis y/o plasma mediante HPLC y espectroscopía de masas para determinar el peso molecular de cualquier metabolito marcado radiactivamente y obtener información estructural de

15 estos metabolitos.

**MÉTODO A5: Método de aislamiento**

20 Se reunieron muestras de orina de estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos del compuesto I a partir de animales individuales de la misma especie, es decir, perro o rata. Se extrajeron las muestras de orina con acetato de etilo a una razón en volumen de 1 a 1 tres veces. Se reunieron las fracciones de extracción con acetato de etilo y se eliminaron los compuestos volátiles usando un rotavapor. Se disolvió el residuo resultante en acetonitrilo:agua (1:1 v/v), y se sometió la disolución a purificación mediante HPLC preparativa. Se logró el aislamiento de cada

25 metabolito usando las tres condiciones de HPLC a continuación en orden secuencial.

Se purificó el extracto concentrado usando una fase móvil que consistía en TFA al 0,1% en agua (disolvente A) y TFA al 0,1% en acetonitrilo (disolvente B), sobre una columna Zobax SB C18 (19x150 mm, 5 Tm) usando un

30 gradiente del 5% al 60% de disolvente B a lo largo de 20 minutos, y una velocidad de flujo de 15 ml/min.

1. Entonces se purificaron adicionalmente las fracciones recogidas de la primera purificación mediante HPLC usando una fase móvil que consistía en TFA al 0,1% en agua (disolvente A) y metanol (disolvente B), sobre una columna

35 Zobax SB C18 (9,6x150 mm, 5 Tm) usando un gradiente del 5% al 95% de disolvente B a lo largo de 25 minutos, y una velocidad de flujo de 4 ml/min.

2. Se sometió cada fracción recogida de la segunda purificación con  $[M+H]^+$  = 321 y 323 a separación quiral usando una fase móvil que consistía en el 15% de etanol y el 85% de hexanos o el 30% de etanol y el 70% de hexanos,

40 sobre una columna quiral (ChiralCel OD-H, 20x250 mm, 5 Tm) con una velocidad de flujo de 15 ml/min.

**MÉTODO A6: Método de análisis**

Se obtuvieron los tiempos de retención para 35, 37 y 38 a partir del análisis de HPLC usando una columna Zorbax SB C18 (4,6x150 mm, 80A, 3,5 Tm) a una temperatura de columna de 40°C usando una fase móvil que consistía en

45 TFA al 0,05% en agua (disolvente A) y TFA al 0,05% en acetonitrilo (disolvente B) con una velocidad de flujo de 1 ml/min. usando un esquema de elución en gradiente mostrado en la tabla 9. Se realizó una detección UV en línea a 220 nm.

Tabla 9. Esquema de elución en gradiente

| Tiempo (min.) | % de ACN |
|---------------|----------|
| 0             | 5        |
| 15            | 95       |

|      |    |
|------|----|
| 18   | 95 |
| 18,5 | 5  |
| 24   | 5  |

MÉTODO A7: Método de análisis alternativo

Se obtuvieron los tiempos de retención para 40, 41 y 42 a partir del análisis de HPLC usando una columna de HPLC Waters Atlantis® T-3 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) con una velocidad de flujo de fase móvil de 400 µl/min. La fase móvil "A" consistía en formiato de amonio 5 mM en agua Millipore con pH ajustado a pH 3,2 con ácido fórmico. La fase móvil "B" consistía en el 100% de metanol. La condición de fase móvil inicial era el 90% de fase móvil "A" / el 10% de fase móvil "B" con un gradiente escalonado hasta el 27% de fase móvil "B" en un minuto. El gradiente inicial progresó entonces de una manera lineal hasta el 52% de fase móvil "B" en 57 minutos, seguido por un segundo gradiente lineal hasta el 95% de fase móvil "B" en 10 minutos. Siguió un periodo de lavado de la columna de cinco minutos al 95% de fase móvil "B" y le siguió un retorno a las condiciones de partida y un reequilibrado de la columna de 8 minutos antes de la siguiente inyección analítica. Se envió el 100% del eluyente de la columna a través de un detector UV de longitud de onda fijada Shimadzu, SPD-10Avp (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EE.UU.) que monitorizaba a λ 254 nm. Tras salir del detector UV, se dividió la corriente de eluyente usando una unión en T PEEK para permitir que aproximadamente 100 µl del eluyente se introdujeran mediante ionización por electrospray en el espectrómetro de masas. Se fijó el voltaje de la fuente de electrospray a 4,5 kV, con una temperatura capilar de 325°C, se fijaron los gases de impulsión y de barrido a 50 y 30 (unidades arbitrarias), respectivamente. Los parámetros de EM/EM dependientes de datos iniciales incluían una anchura de aislamiento de 2,0 uma y un parámetro de energía de colisión de 42. Se optimizaron todos los otros potenciales y parámetros instrumentales para lograr una razón de señal con respecto a ruido máxima para el compuesto I.

MÉTODO A8: Hidrólisis enzimática de metabolitos de glucurónido del compuesto I.

Se incubaron metabolitos de conjugado de glucurónido aislados del compuesto I con β-glucuronidasa avanzando la reacción hasta el final en todos los casos, produciendo la aglicona asociada, que se analizó usando el mismo método de CL-EM que se describió anteriormente. Se compararon los tiempos de reacción y los espectros de masas de las agliconas liberadas con los tiempos de reacción y los espectros de masas de los patrones de metabolitos hidroxilados sólo una vez del compuesto I para asignar la identidad del conjugado.

Ejemplo B:

Se supuso que las muestras de metabolitos de peso molecular de 323 eran metabolitos que contenían hidroxilo y se disolvieron en 200 µl de CD<sub>3</sub>OD, obtenido de Isotec. Se supuso que muestras de peso molecular 321 contenían un resto cetona y se disolvieron en 200 µl de CDCl<sub>3</sub>, obtenido de Isotec. Se disolvieron muestras que eran de un peso molecular distinto del descrito anteriormente en 200 µl de DMSO-d<sub>6</sub>, también obtenido de Isotec. Tras la disolución, se colocó cada muestra en un tubo de RMN de 3 mm, obtenido de Wilmad Glass. Se prepararon las muestras inmediatamente antes del análisis.

Se analizaron las muestras usando un espectrómetro de RMN Varian INOVA que funcionaba a 500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C. Se usó una sonda de gradiente de detección inverso de resonancia triple de 3 mm. Se mantuvo la muestra a 30°C durante el tiempo que tuvo lugar toda la adquisición de datos. Se bloqueó la sonda y se niveló para cada muestra. Se realizaron otros experimentos de RMN para obtener los datos necesarios para determinar la estructura.

Compuesto 31 <sup>1</sup>H(500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 8,58 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 4,47 (td, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,18 (dd, 1H), 3,13 (dd, 1H), 2,35 (m, 1H), 1,79 (m, 2H), 1,59-1,39 (m, 4H), 1,29 (m, 2H).

Compuesto 32 <sup>1</sup>H(500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 9,24 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 4,56 (td, 1H), 3,82 (s, 2H), 3,17 (dd, 1H), 3,11 (dd, 1H), 2,35 (m, 1H), 1,79-1,12 (m, 4H), 1,61-1,45 (m, 4H).

Compuesto 35 <sup>1</sup>H(500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 12,25 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,64 (m, 1H), 7,08 (m, 1H), 4,93 (dd, J=11,6, 3,3, 1 H), 3,76 (d, J=4,8, 1 H), 3,52 (dd, J=17,2, 11,7, 1H), 3,08 (dd, J=17,4, 3,6), 2,04 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,63 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 0,95 (m, 1H).

Compuesto 37 <sup>1</sup>H(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,71 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 4,22 (td, J=9,6, 3,7, 1H), 3,71 (s, 2H), 3,09 (dd, J=17,0, 9,1, 1H), 2,91 (dd, J=16,8, 3,7, 1H), 2,55 (m, 1H), 1,94 (m, 1H), 1,80-1,45 (m, 5H), 1,27 (m, 1H), 1,19 (m, 1H).

Compuesto 38 <sup>1</sup>H(500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 11,35 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 4,55 (td, J=9,8, 3,8,

1H), 4,10 (m, 1H), 3,79 (s, 2H), 3,19 (dd, J=16,9, 9,5, 1H), 3,13 (dd, J=17,5, 4,5, 1H), 2,39 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,48-1,07 (m, 4H).

#### Ejemplo C:

5 Los datos de actividad para los metabolitos 1-39, junto con los datos de aclaramiento intrínseco y fracción libre, pueden compararse con los del compuesto original, compuesto I. Se describen a continuación ensayos de actividad de JAK, ensayos de fracción libre y ensayos de aclaramiento intrínseco. Pueden obtenerse puntos de datos para estereoisómeros individuales de los metabolitos 1-39. Los metabolitos pueden ser inhibidores potentes de JAK1, 10 JAK2 y JAK3, como el compuesto I.

#### Ensayo de cinasa JAK *in vitro*

15 Los compuestos descritos en el presente documento en el presente documento pueden someterse a prueba para determinar su actividad inhibidora de dianas de JAK según el siguiente ensayo *in vitro* descrito en Park *et al.*, Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104. Pueden expresarse los dominios catalíticos de JAK1 humana (a.a. 837-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) y JAK3 (a.a. 781-1124) con una etiqueta de His N-terminal usando baculovirus en células de insectos y purificarse. Puede someterse a ensayo la actividad catalítica de JAK1, JAK2 o JAK3 midiendo la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado puede detectarse mediante fluorescencia de 20 resolución temporal homogénea (HTRF). Pueden medirse  $Cl_{50}$  de los compuestos para cada cinasa en las reacciones que contienen la enzima, ATP y péptido 500 nM en tampón Tris 50 mM (pH 7,8) con NaCl 100 mM, DTT 5 mM y BSA 0,1 mg/ml (0,01%). La concentración de ATP en las reacciones puede ser 90  $\mu$ M para Jak1, 30  $\mu$ M para Jak2 y 3  $\mu$ M para Jak3. Pueden llevarse a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 1 h y entonces detenerse con 20  $\mu$ l de EDTA 45 mM, SA-APC 300 nM, Eu-Py20 6 nM en tampón de ensayo (Perkin Elmer, Boston, 25 MA). La unión al anticuerpo marcado con europio puede ser durante 40 minutos y la señal de HTRF puede medirse en un lector de placas Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). Compuestos que tienen una  $Cl_{50}$  de 10  $\mu$ M o menos para cualquiera de las dianas de JAK mencionadas anteriormente puede considerarse activo.

#### Ensayo de fracción libre

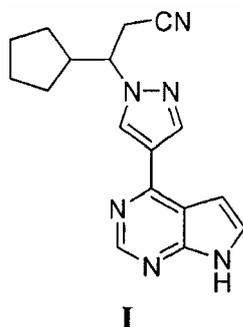
30 Puede determinarse la unión a proteína de un compuesto de prueba mediante diálisis en equilibrio usando un sistema Dianorm del aparato Harvard (Holliston, MA). Puede realizarse la diálisis a 37°C durante 2 h en suero humano. Pueden incubarse los metabolitos a 3  $\mu$ M, y el compuesto I a 3 y 10  $\mu$ M. Pueden determinarse las concentraciones de compuesto en suero y tampón tras la diálisis mediante análisis de CL/EM/EM. Se define la 35 fracción libre como la razón del tampón frente a la concentración sérica.

#### Ensayo de aclaramiento intrínseco

40 Puede determinarse el aclaramiento intrínseco incubando 1  $\mu$ M de compuesto de prueba en microsomas hepáticos humanos de género mixto (proteína 0,5 mg/ml) a 37°C en presencia de NADPH 1 mM. Puede monitorizarse la desaparición del compuesto de prueba mediante CL/EM a 0, 5, 10, 20 y 30 min. Puede usarse la pendiente de disminución de la concentración de compuesto para calcular el aclaramiento intrínseco humano empleando métodos convencionales notificados en la bibliografía.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I:



5

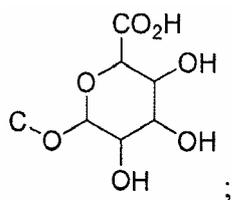
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10

n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH; o,

un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O; o,

un grupo C-H está sustituido con:

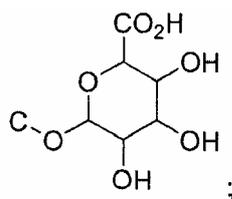


15

o,

20

dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:



y

25

n es 1, 2, 3 ó 4;

siempre que el compuesto no se seleccione de:

30

3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;

3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-oxociclopentil)propanonitrilo;

35

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

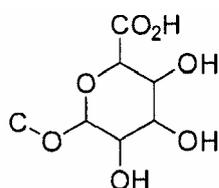
2. Compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

40

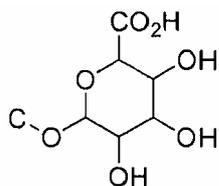
el átomo de carbono alfa con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH o C=O; y

el átomo de carbono beta con respecto al grupo ciano no está sustituido con un grupo C-OH.

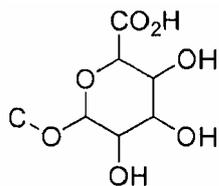
3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH.
- 5 4. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n es 1.
5. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n es 2.
6. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n es 3.
- 10 7. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que n es 4.
8. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que un grupo CH<sub>2</sub> está sustituido independientemente con un C=O.
- 15 9. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que un grupo C-H está sustituido con



- 20 10. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que un grupo C-H saturado está sustituido con



- 25 11. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dos grupos C-H están sustituidos cada uno independientemente con C-OH y un grupo C-H está sustituido con:



- 30 12. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de:
- ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- 35 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1,2-dihidroxiciclopentil)propanonitrilo; y
- 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;
- o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.
- 40 13. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de:
- 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(1-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;
- 45 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentil-3-hidroxipropanonitrilo;
- 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentil-2-hidroxipropanonitrilo;



- 3-(4-(2-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;
- 5 3-(4-(5-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;
- 3-(4-(6-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(3-hidroxiciclopentil)propanonitrilo;
- 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentil-2,3-dihidroxi-propanonitrilo;
- 10 3-ciclopentil-3-hidroxi-3-(3-hidroxi-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-hidroxi-3-(4-(2-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 15 3-ciclopentil-3-hidroxi-3-(4-(5-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-hidroxi-3-(4-(6-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-hidroxi-3-(5-hidroxi-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 20 3-ciclopentil-2-hidroxi-3-(3-hidroxi-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-2-hidroxi-3-(4-(2-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 25 3-ciclopentil-2-hidroxi-3-(4-(5-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-2-hidroxi-3-(4-(6-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-2-hidroxi-3-(5-hidroxi-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 30 3-ciclopentil-3-(3,5-dihidroxi-4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(3-hidroxi-4-(2-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 35 3-ciclopentil-3-(3-hidroxi-4-(5-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(3-hidroxi-4-(6-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(4-(2,5-dihidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 40 3-ciclopentil-3-(4-(2,6-dihidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(4-(5,6-dihidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 45 3-ciclopentil-3-(5-hidroxi-4-(2-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(5-hidroxi-4-(5-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 3-ciclopentil-3-(5-hidroxi-4-(6-hidroxi-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;
- 50 cianuro de 2-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-ciclopentilacetilo;
- 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-(2-oxociclopentil)propanonitrilo;
- 55 ácido 6-(1-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- ácido 6-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-ciano-1-ciclopentiletoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- 60 ácido 6-(2-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- ácido 6-(2-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-ciano-2-ciclopentiletoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico; y
- 65 ácido 6-(3-(1-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-2-cianoetil)ciclopentiloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-

piran-2-carboxílico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

5 14. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de:

3-ciclopentil-3-(4-(2,6-dioxo-3,5,6,7-tetrahidro-2H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

10 3-ciclopentil-3-(4-(2-hidroxi-6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-ciclopentil-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

3-(3-hidroxiciclopentil)-3-(4-(6-oxo-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo;

15 3-ciclopentil-3-(4-(5,6-dihidroxi-6,7-dihidro-5H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)propanonitrilo; y

ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-7-il)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

20 o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

15. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de:

25 ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-iloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-6-iloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

30 ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-2-iloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico; y

ácido 6-(4-(1-(2-ciano-1-ciclopentiletil)-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-7-iloxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;

35 o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mencionados anteriormente.

16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que está sustancialmente aislado.

40 17. Composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

18. Composición según la reivindicación 17, que es adecuada para administración oral.