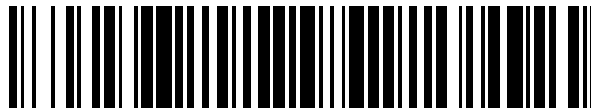


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 868**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08770791 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2173751**

54 Título: **Metabolitos del inhibidor de cinasas Janus (R)-3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo**

30 Prioridad:

**13.06.2007 US 943695 P**

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

**17.03.2014**

73 Titular/es:

**INCYTE CORPORATION (100.0%)  
EXPERIMENTAL STATION, ROUTE 141 & HENRY  
CLAY ROAD, BUILDING E336  
WILMINGTON, DE 19880, US**

72 Inventor/es:

**RODGERS, JAMES D.;  
ARVANITIS, ARGYRIOS G. y  
SHI, JACK GUOEN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 448 868 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).

**Metabolitos del inhibidor de cinasas Janus (R)-3-(4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo****DESCRIPCIÓN****CAMPO DE LA INVENCION**

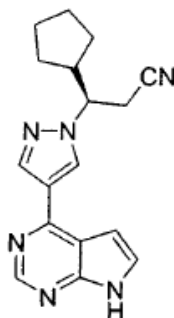
La presente invención proporciona metabolitos activos de (R)-3-(4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo que modulan la actividad de cinasas Janus y son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de cinasas Janus que incluyen, por ejemplo, enfermedades inmunorrelacionadas, trastornos de la piel, trastornos proliferativos mieloides, cáncer y otras enfermedades.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las proteínas cinasas (PK) son un grupo de enzimas que regulan diversos procesos biológicos importantes que incluyen crecimiento, supervivencia y diferenciación celular, formación de órganos y morfogénesis, neovascularización, reparación y regeneración de tejido, entre otros. Las proteínas cinasas ejercen sus funciones fisiológicas mediante la catalización de la fosforilación de proteínas (o sustratos) y modulando así las actividades celulares de los sustratos en diversos contextos biológicos. Además de las funciones en tejidos/órganos normales, muchas proteínas cinasas también desempeñan funciones más especializadas en un receptor de enfermedades humanas que incluyen cáncer. Un subconjunto de proteínas cinasas (también denominadas proteínas cinasas oncogénicas), cuando se desregulan, pueden producir formación y crecimiento tumoral, y adicionalmente contribuyen al mantenimiento y progresión tumoral (Blume-Jensen P y col., Nature 2001, 411(6835):355-365). Hasta ahora, las proteínas cinasas oncogénicas representan uno de los mayores grupos y más atractivos de dianas de proteína para la intervención de cáncer y el desarrollo de fármacos.

La familia de las cinasas Janus (JAK) desempeña una función en la regulación dependiente de citocinas de la proliferación y función de células que participan en respuesta inmunitaria. Actualmente hay cuatro miembros de la familia JAK de mamífero conocidos: JAK1 (también conocida como cinasa Janus 1), JAK2 (también conocida como cinasa Janus 2), JAK3 (también conocida como leucocito de la cinasa Janus; JAKL; L-JAK y cinasa Janus 3) y TYK2 (también conocida como proteína tirosina cinasa 2). Las proteínas JAK oscilan en tamaño de 120 a 140 kDa y comprenden siete dominios de homología de JAK (JH) conservados; uno de estos es un dominio de cinasa catalítico funcional, y el otro es un dominio pseudo-cinasa que posiblemente sirve de función reguladora y/o sirve de sitio de enlace para STAT (Scott, Godshall y col. 2002, arriba).

El bloqueo de la transducción de señales al nivel de las cinasas JAK mantiene la promesa de desarrollar tratamientos para cánceres humanos. La inhibición de las cinasas JAK también se prevé que tenga beneficios terapéuticos en pacientes que padecen trastornos de la piel inmunitarios tales como psoriasis, y sensibilización de la piel. Por consiguiente, se buscan ampliamente inhibidores de cinasas Janus o cinasas relacionadas y varias publicaciones informan de clases eficaces de compuestos. Por ejemplo, ciertos inhibidores de JAK, que incluyen (R)-3-(4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo mostrados más adelante, se informan en la patente de EE.UU. n° de serie 11/637.545 presentada el 12 de diciembre de 2006.



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

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un compuesto seleccionado de:

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

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

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 La presente invención proporciona además uno o más de los compuestos anteriores, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en forma sustancialmente aislada.

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden un compuesto de la invención, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención proporciona además procedimientos de modulación de una actividad de JAK *ex vivo* que comprenden poner en contacto JAK con un compuesto de la presente invención, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 La presente invención proporciona además un compuesto de la invención, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente. La presente invención proporciona además los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en un procedimiento para tratar el cuerpo humano o animal por terapia.

20 La presente invención proporciona además los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en un procedimiento para tratar una o más de las enfermedades descritas en el presente documento.

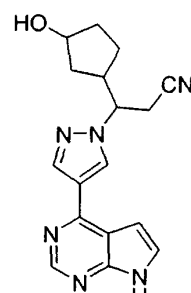
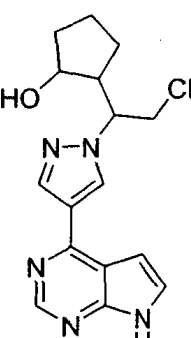
25 La presente invención proporciona además el uso de los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la preparación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar una o más de las enfermedades descritas en el presente documento.

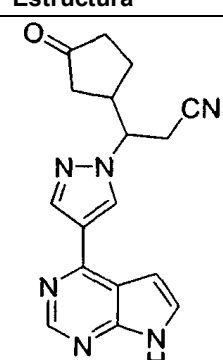
**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

30 La presente invención proporciona, entre otros, compuestos que son metabolitos activos del inhibidor de JAK (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-yl)-1H-pirazol-1-yl)-3-ciclopentilpropanonitrilo. Estos metabolitos modulan la actividad de una o más JAK y son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades asociadas a expresión o actividad de JAK. Los metabolitos de la invención se indican en la siguiente Tabla 1. Las estructuras pretenden engloban todos los posibles estereoisómeros.

35

**Tabla 1**

Referencia	Nombre	Estructura
40 45 50	Metabolito 1 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-yl)-1H-pirazol-1-yl)-3-(3 hydroxycyclopentyl) propanenitrile	
55 60 65	Metabolito 2 3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-yl)-1H-pirazol-1-yl)-3-(2-hydroxycyclopentyl)propanenitrile	

Referencia	Nombre	Estructura
Metabolito 3	3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-yl)-1H-pirazol-1-yl)-3-(3-oxociclopentyl) propanenitrile	

Los metabolitos de la invención se aislaron de muestras de orina de rata o perro recogidas de estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos del inhibidor de JAK (R)-3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo (Compuesto 1). Como se muestra en la Tabla 2 y se detalla en el Ejemplo A, los metabolitos son inhibidores de JAK activos y potentes y tienen ventajosas propiedades relacionadas con fracciones libres significativamente mayores y mayor estabilidad metabólica en microsomas humanos en comparación con el compuesto 1. Estos datos sugieren que los presentes metabolitos pueden tener deseablemente una mayor semivida de eliminación en seres humanos que el compuesto 1.

En algunas realizaciones, los metabolitos de la invención están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislados" se indica que el compuesto está al menos parcialmente o sustancialmente separado del entorno 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. Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos desvelados en los que el compuesto parental se modifica convirtiendo un resto de ácido o base existente en su forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos de ácido tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto parental formado, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran 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), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

El término "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuado para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

Los metabolitos son asimétricos (por ejemplo, tienen uno o más estereocentros). Están previstos todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diaestereómeros, a menos que se indique lo contrario. Procedimientos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos se conocen en la técnica, tales como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva.

Los compuestos de la invención 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 diferente número másico. Por ejemplo, isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

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

*Síntesis*

Los compuestos de la invención, que incluyen sales de los mismos, pueden prepararse usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden sintetizarse según cualquiera de las numerosas posibles rutas de síntesis.

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

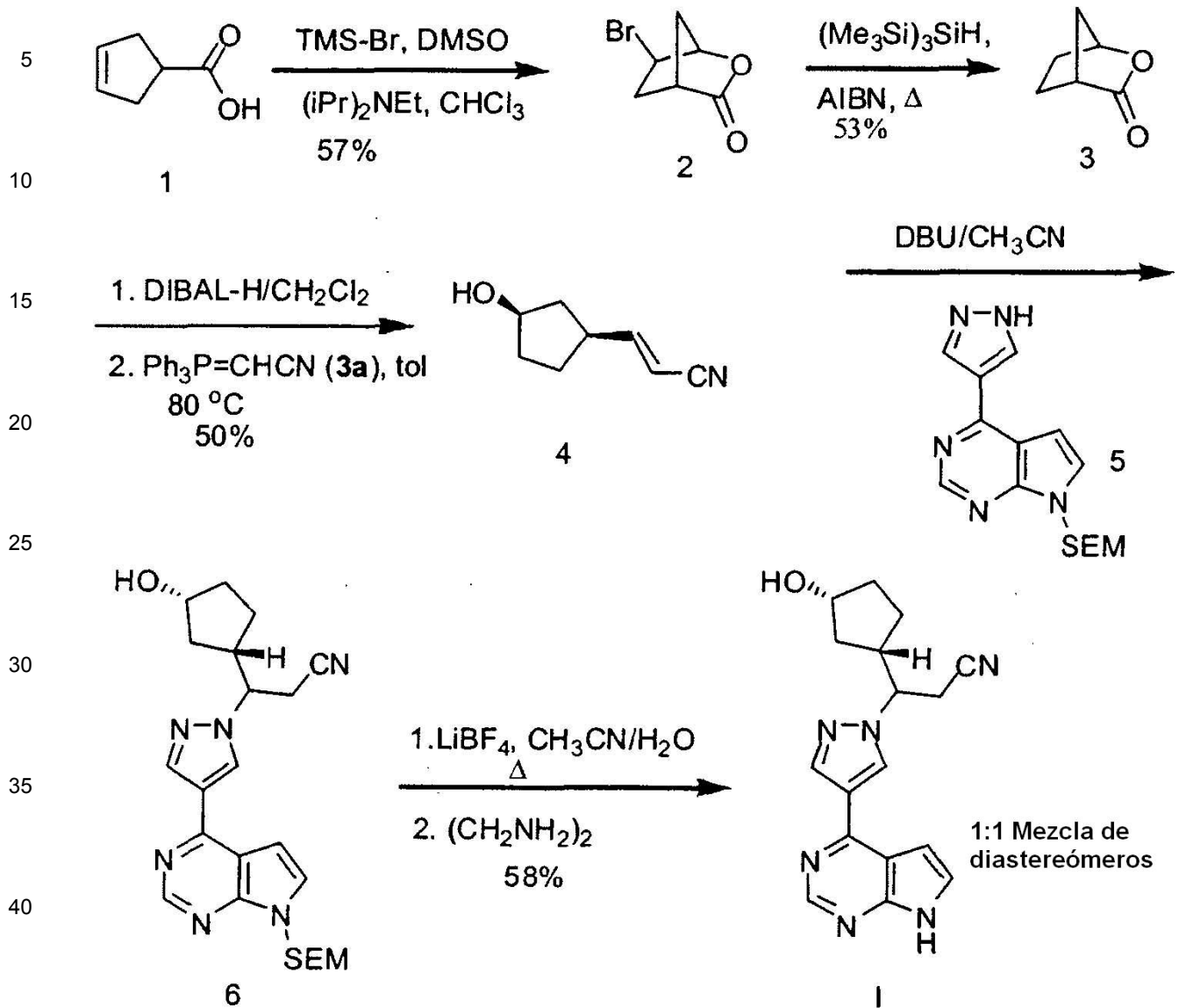
La preparación de compuestos de la invención puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados, puede determinarse fácilmente por un experto en la materia. La química de grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3ª ed., Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.  
15

Las reacciones pueden monitorizarse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos puede monitorizarse por medios espectroscópicos tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible) o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina.  
20

Los compuestos de la invención pueden prepararse según numerosas vías preparatorias conocidas en la bibliografía. Ejemplos de procedimientos sintéticos para preparar los compuestos de la invención se proporcionan en los esquemas a continuación.  
25

Como se muestra en el Esquema 1, la síntesis de la mezcla diaestereomérica de los cis-alcoholes I empieza con ácido ciclopentenocarboxílico 1. El ácido ciclopentenocarboxílico 1 se bromolactoniza siguiendo un procedimiento descrito anteriormente (Hodgson, David M.; Witherington, Jason; Moloney, Brian A., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, 1994, 23, 3950) dando la bromolactona 2 correspondiente. La bromolactona 2 se desbroma con el uso de un agente de deshalogenación, tal como  $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiH}$  dando 3. La lactona 3 se reduce al hemiacetal correspondiente con el uso de un agente reductor, tal como DIBAL-H; el hemiacetal formado se trata directamente con el iluro 3a dando el derivado de crotonitrilo 4. El nitrilo 4 reacciona entonces con el pirazol 5 en presencia de una base tal como DBU dando 6 como una mezcla de diaestereómeros, que se convierte en los alcoholes I después de eliminar el grupo SEM. Los estereoisómeros individuales de esta mezcla (I) pueden separarse por cromatografía quiral dando los alcoholes enantioméricamente puros (4 estereoisómeros totales).  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Esquema 1



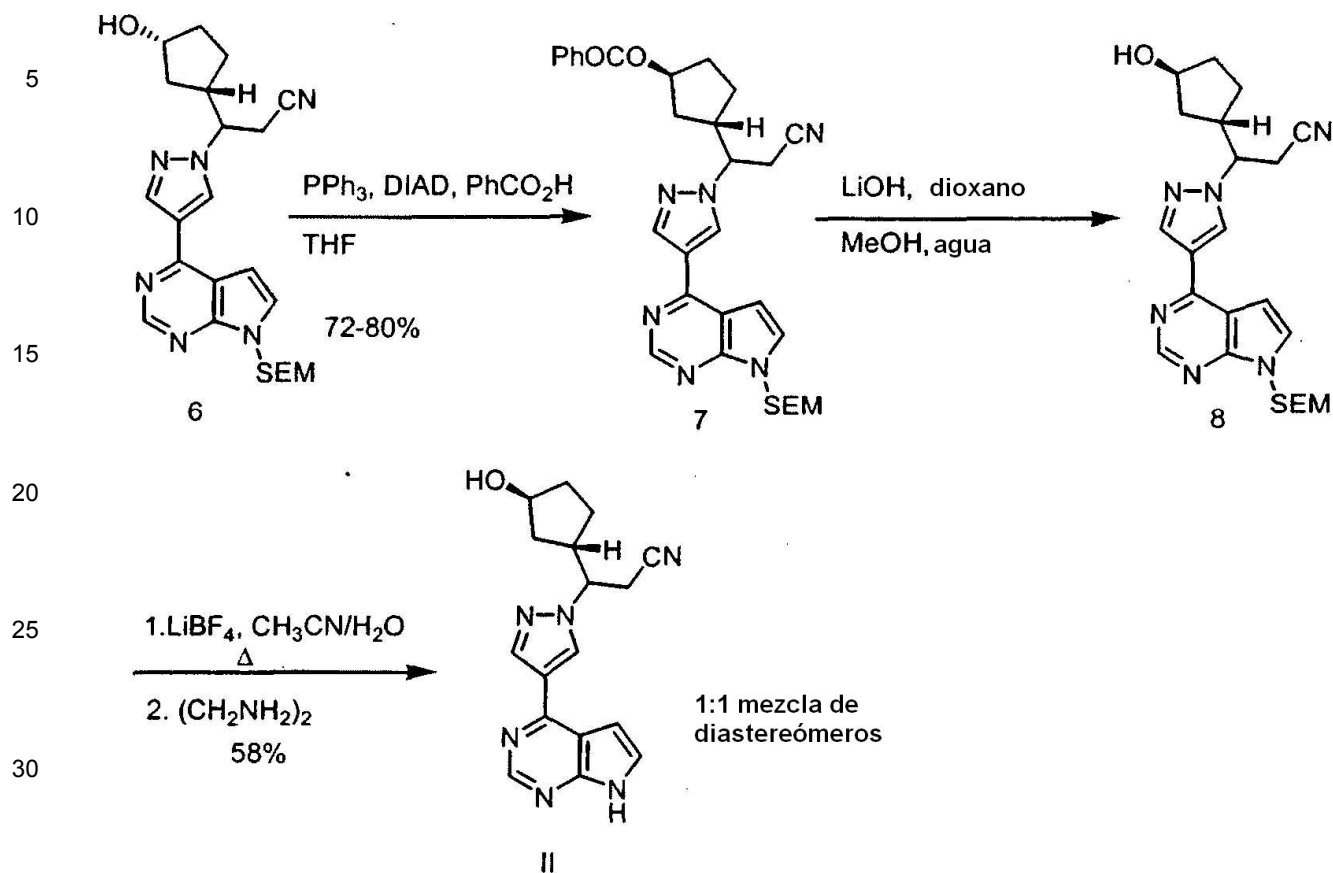
Como se muestra en el Esquema 2, la síntesis de los trans-alcoholes II empieza con la mezcla diaestereomérica de alcoholes 6. La mezcla diaestereomérica de los alcoholes 6 se trata con ácido benzoico bajo condiciones de Mitsunobu dando una mezcla de los trans-benzoatos 7 con inversión completa. La mezcla de los benzoatos 7 se hidroliza mediante tratamiento con una base tal como LiOH dando una mezcla de los trans-alcoholes 8. El grupo SEM dentro de los alcoholes 8 se elimina luego dando la mezcla diaestereomérica de los trans-alcoholes II, que se separa por cromatografía quiral dando estereoisómeros individuales (4 estereoisómeros totales).

55

60

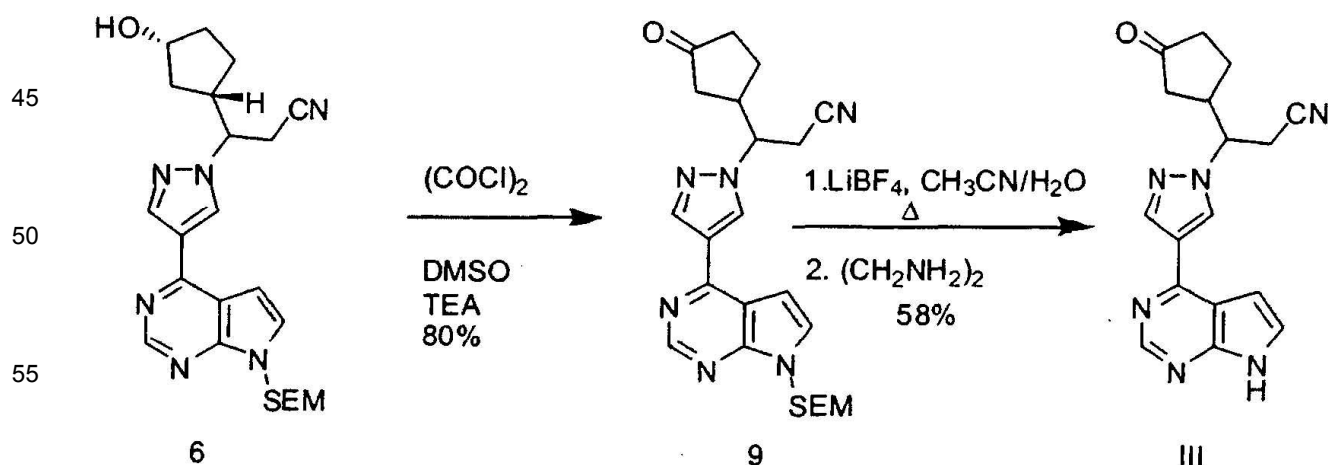
65

Esquema 2



La síntesis de las cetonas III se describe en el Esquema 3. Una mezcla de los cis-alcoholes 6 puede oxidarse bajo condiciones de Swern dando la mezcla correspondiente de cetonas 9. El grupo SEM dentro de las cetonas 9 se elimina dando una mezcla de la cetona III, que puede separarse por cromatografía quiral dando los estereoisómeros individuales (4 estereoisómeros totales).

Esquema 3



Procedimientos

Los compuestos de la invención pueden modular la actividad de una o más cinasas Janus (JAK). El término "modular" pretende referirse a una capacidad para aumentar o disminuir la actividad de uno o más miembros de la familia JAK de cinasas. Por consiguiente, los compuestos de la invención pueden usarse en procedimientos de modulación de una JAK poniendo en contacto la JAK con uno cualquiera o más de los compuestos o composiciones descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden

actuar de inhibidores de una o más JAK. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden actuar estimulando la actividad de una o más JAK. En otras realizaciones, los compuestos de la invención pueden usarse para modular la actividad de una JAK en un individuo en necesidad de modulación del receptor administrando una cantidad moduladora de un compuesto de la invención.

5 JAK con las que los presentes compuestos se unen y/o modulan incluyen 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 Los compuestos de la invención pueden ser selectivos. Por "selectivos" se indica que el compuesto se une a o inhibe una JAK con mayor afinidad o potencia, respectivamente, en comparación con al menos otra JAK. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención son inhibidores selectivos de JAK1 o JAK2 con respecto a JAK3 y/o TYK2. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención son inhibidores selectivos de JAK2 (por ejemplo, con respecto a JAK1, JAK3 y TYK2). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, debido a que 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 cáncer (tal como mieloma múltiple, por ejemplo) puede ofrecer la ventaja adicional de tener menos efectos secundarios inmunosupresores. La selectividad puede ser al menos aproximadamente 5 veces, 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 procedimientos rutinarios en la materia. En algunas realizaciones, la selectividad puede probarse en la Km de cada enzima. En algunas realizaciones, la selectividad de compuestos de la invención por JAK2 con respecto a JAK3 puede determinarse por la concentración de ATP celular.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo para su uso en procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno asociado a JAK en un individuo (por ejemplo, paciente) administrando al individuo en necesidad de tal tratamiento una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o composición farmacéutica. Una enfermedad asociada a JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que esté directamente o indirectamente ligada a expresión o actividad de JAK, que incluye expresión en exceso y/o niveles de actividad anormales. Una enfermedad asociada a JAK también pueden incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que pueda prevenirse, mejorarse o curarse modulando actividad de JAK.

30 Ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades que implican el sistema inmunitario que incluyen, por ejemplo, rechazo de trasplante de órgano (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto frente a huésped).

35 Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades autoinmunes 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 inmunoglobulina, trastornos tiroideos autoinmunes, y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune es un trastorno de la piel bulloso autoinmune tal como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide bulloso (PB).

40 Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen afecciones alérgicas tales como asma, alergias alimentarias, dermatitis atópica y rinitis. Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades virales tales como virus de Epstein Barr (EBV), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus de la varicela zóster (VVZ) y virus del papiloma humano (VPH).

45 Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas a JAK incluyen trastornos de la piel tales como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgar), dermatitis atópica, erupción cutánea, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto o dermatitis alérgica de contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias que incluyen algunos productos farmacéuticos cuando se aplican tópicamente pueden producir sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, la co-administración o administración secuencial de al menos un inhibidor de JAK de la invención junto con el agente causante de sensibilización no deseada puede ser útil en el tratamiento de tal sensibilización no deseada o dermatitis. En algunas realizaciones, el trastorno de la piel se trata por administración tópica de al menos un inhibidor de JAK de la invención.

50 En otras realizaciones, la enfermedad asociada a JAK es cáncer que incluye aquellos 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 la cabeza y el 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 linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT) y linfoma cutáneo de linfocitos B. Ejemplos de linfomas cutáneos de linfocitos T incluyen síndrome de Sezary y micosis fungoide.

65 Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir adicionalmente aquellas caracterizadas por expresión de una JAK2 mutante tal como aquellas que tienen al menos una mutación en el dominio pseudo-cinasa (por ejemplo,



JAK2V617F).

Las enfermedades asociadas a JAK pueden incluir adicionalmente trastornos mieloproliferativos (TMP) tales como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mielode con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE), enfermedad sistémica de mastocitos (ESM), y similares.

Otras enfermedades asociadas a JAK incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis, o enfermedad relacionada), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (por ejemplo, las vías respiratorias superiores que incluyen la nariz y los senos tales como rinitis o sinusitis o las vías respiratorias inferiores que incluyen bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y similares), miopatía inflamatoria tal como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias. Otras enfermedades inflamatorias tratables por los compuestos de la invención incluyen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y choque séptico.

Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar lesiones de isquemia-reperusión o una enfermedad o afección relacionada con un evento isquémico inflamatorio tal como accidente cerebrovascular o parada cardíaca. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar anorexia, caquexia o fatiga tal como aquella resultante de o asociada a cáncer. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar reestenosis, esclerodermis o fibrosis. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar afecciones asociadas a hipoxia o astrogliosis tales como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer o neurodegeneración. Véase, por ejemplo, Dudley, A.C. y col. *Biochem. J.* 2005, 390(Pt 2):427-36 y Sriram, K. y col. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(19):19936-47. Publicación electrónica de 2 de marzo de 2004.

Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar gota y elevado tamaño de próstata debido a, por ejemplo, hipertrofia prostática benigna o hiperplasia prostática benigna.

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

Como se usa en el presente documento, el término "individuo" o "paciente," usados indistintamente, se refiere a cualquier animal, que incluye mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, caballos o primates, y lo más preferentemente seres humanos.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal que está siendo buscada en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro profesional clínico.

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, afección o trastorno en un individuo que puede tener predisposición a la enfermedad, afección o trastorno, pero que todavía no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; y (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, invertir la patología y/o sintomatología) tal como disminuir la gravedad de la enfermedad.

#### *Terapias de combinación*

Uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como, por ejemplo, quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, además de inhibidores de cinasas Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK tales como, por ejemplo, aquellos descritos en el documento WO 2006/056399, u otros agentes, pueden usarse en combinación con los compuestos de la presente invención para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociados a JAK. El uno o más agentes farmacéuticos adicionales pueden administrarse a un paciente simultáneamente o secuencialmente.

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

Ejemplos de esteroides incluyen corticosteroides tales como dexametasona o prednisona.

Ejemplos de inhibidores de Bcr-Abl incluyen los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de los géneros y especies desvelados en la patente de EE.UU. n° 5.521.184, documentos WO 04/005281, EP2005/009967, EP2005/010408 y la patente de EE.UU. n° de serie 60/578.491.

Ejemplos de inhibidores de Flt-3 adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se desvela en los documentos WO03/037347, WO 03/099771 y WO 04/046120.

Ejemplos de inhibidores de RAF adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se desvela en los documentos WO 00/09495 y WO 05/028444.

Ejemplos de inhibidores de FAK adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se desvela 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, uno o más de los metabolitos de la invención pueden usarse en combinación con uno o varios de otros inhibidores de cinasas que incluyen imatinib, particularmente para tratar pacientes resistentes a imatinib u otros inhibidores de cinasas.

En algunas realizaciones, uno o más inhibidores de JAK de la invención pueden usarse en combinación con un quimioterapéutico en el tratamiento de cáncer, tal como mieloma múltiple, y pueden mejorar la respuesta de tratamiento con respecto a la respuesta al agente quimioterapéutico solo, sin exacerbación de sus efectos tóxicos. Ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple, por ejemplo, pueden incluir, sin limitación, melfalan, melfalan más prednisona [MP], doxorubicina, dexametasona y Velcade (bortezomib). Otros agentes adicionales usados en el tratamiento de mieloma múltiple incluyen inhibidores de cinasas Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK. Efectos aditivos o sinérgicos son desenlaces deseables de combinar un inhibidor de JAK 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 inhibidor de JAK de la presente invención. Los agentes pueden combinarse con los presentes compuestos en una forma de dosificación única o continua, o los agentes pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente como formas de dosificación separadas.

En algunas realizaciones, un corticosteroide tal como dexametasona se administra a un paciente en combinación con al menos un inhibidor de JAK cuando la dexametasona se administra intermitentemente a diferencia de continuamente.

En algunas otras realizaciones, las combinaciones de uno o más inhibidores de JAK de la invención con otros agentes terapéuticos pueden administrarse a un paciente antes de, durante, y/o después de un trasplante de médula ósea o trasplante de citoblastos.

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

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden prepararse de un modo muy conocido en la técnica farmacéutica, y pueden administrarse mediante una variedad de vías, que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o infusión; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede estar en forma de una dosis de un único bolo, o puede ser, por ejemplo, por una bomba de perfusión continua. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos de la invención anterior en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (excipientes). En la preparación de las composiciones de la invención, el principio activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de un vehículo tal en forma de, por ejemplo, una cápsula, sobre, papel y otro recipiente. Si el excipiente sirve de diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido, que actúa de vehículo, soporte o medio para el principio activo. Así, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, 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.

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

Los compuestos de la invención pueden 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. Las preparaciones finamente divididas (nanopartícula) de los compuestos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la solicitud de patente internacional n° WO 2002/000196.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, 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 propilhidroxi-benzoatos; edulcorantes; y aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que se proporcione liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg (1 g), más normalmente aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg, del principio activo. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas 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.

El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificación y generalmente se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto en realidad administrada se determinará normalmente por un médico, según las circunstancias relevantes, que incluyen la afección que va a tratarse, la vía de administración elegida, el actual compuesto administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el principio activo se dispersa normalmente uniformemente en toda la composición de manera que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide entonces en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg del principio activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, estando el último en forma de una envoltura sobre el anterior. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir a la desintegración 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 entéricas o recubrimientos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como Shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

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

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe arriba. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse usando gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una tienda facial, o respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión o polvo pueden administrarse por vía oral

o nasalmente de dispositivos que administración de la formulación de una manera apropiada.

La cantidad de compuesto o composición administrada a un paciente variará dependiendo de lo que esté siendo administrado, el fin de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, el modo de administración, y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Dosis eficaces dependerán de la condición de enfermedad que esté tratándose, además del criterio del profesional clínico adjunto dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y condición general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en forma de composiciones farmacéuticas como se ha descrito anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones del compuesto normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9, y lo más preferentemente de 7 a 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los anteriores excipientes, vehículos o estabilizadores producirá la formación de sales farmacéuticas.

La dosificación terapéutica de los compuestos de la presente invención puede variar, por ejemplo, según el uso particular para el que el tratamiento esté hecho, el modo de administración del compuesto, la salud y condición del paciente y el criterio del médico prescriptor. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores que incluyen dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobia) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en una disolución fisiológica acuosa de tampón que contiene de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % en peso/volumen del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicas son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. La dosificación es probable que dependa de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o 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. Dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animales.

Las composiciones de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como un quimioterapéutico, esteroide, compuesto antiinflamatorio o inmunosupresor, ejemplos de los cuales se enumeran anteriormente en este documento.

#### *Compuestos marcados y procedimientos de ensayo*

Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos marcados de la invención (radiomarcados, marcados con fluorescencia, etc.) que serían útiles no solo 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, que incluye ser humano, y para identificar ligandos de JAK por unión de la inhibición de un compuesto marcado. Por consiguiente, la presente invención incluye ensayos de JAK que contienen tales compuestos marcados.

La presente invención incluye adicionalmente compuestos isotópicamente marcados de la invención. Un compuesto "isotópicamente" o "radiomarcado" es un compuesto de la invención en el que uno o más átomos están reemplazados o sustituidos con 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 naturalmente). Radionúclidos adecuados que pueden incorporarse en compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a,  $^2\text{H}$  (también escrito como D por deuterio),  $^3\text{H}$  (también escrito como T por 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 el marcado de metaloproteasa *in vitro* y ensayos de competición, 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 obtención de radio-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.

Se entiende que un "compuesto radiomarcado" o "marcado" es un compuesto que ha incorporado al menos un radionúclido. En algunas realizaciones, el radionúclido está seleccionado del grupo que consiste en  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{82}\text{Br}$ .

La presente invención puede incluir adicionalmente procedimientos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos de la invención. Los procedimientos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos orgánicos son muy conocidos en la técnica, y un experto habitual en la materia reconocerá fácilmente los procedimientos aplicables a los compuestos de invención.

Un compuesto marcado de la invención puede usarse en un ensayo de cribado para identificar/evaluar

compuestos. Por ejemplo, un compuesto recientemente sintetizado o identificado (es decir, compuesto de prueba) que se marca puede evaluarse para su capacidad para unirse a JAK monitorizando su variación de la concentración cuando se pone en contacto con la JAK, mediante monitorización del marcado. Por ejemplo, un compuesto de prueba (marcado) puede evaluarse para su capacidad para reducir la unión de otro compuesto que se sabe que se une a una JAK (es decir, compuesto convencional). Por consiguiente, la capacidad de un compuesto de prueba para competir con el compuesto convencional para unirse a la JAK se correlaciona directamente con su afinidad de unión. En cambio, en algunos otros ensayos de cribado, el compuesto convencional se marca y los compuestos de prueba no se marcan. Por consiguiente, la concentración del compuesto convencional marcado se monitoriza con el fin de evaluar la competición entre el compuesto convencional y el compuesto de prueba, y así se determina la afinidad de unión relativa del compuesto de prueba.

#### Kits

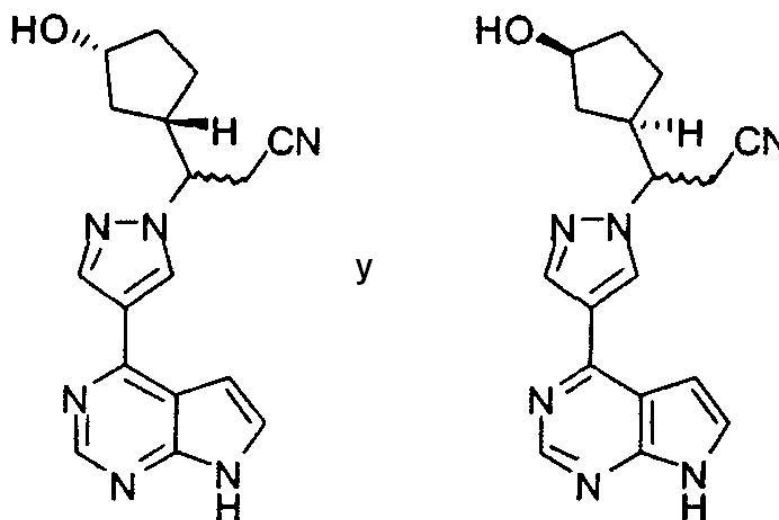
La presente invención también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos asociados a JAK, tales como cáncer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. Tales kits pueden incluir adicionalmente, si se desea, uno o más de diversos componentes de kits farmacéuticos convencionales tales como, por ejemplo, recipientes con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como será rápidamente evidente para aquellos expertos en la materia. Instrucciones, tanto como panfletos como etiquetas, que indican cantidades de los componentes que van a administrarse, pautas para administración y/o pautas para mezclar los componentes, también pueden incluirse en el kit.

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 en ningún modo. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse dando esencialmente los mismos resultados.

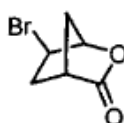
#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1:

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



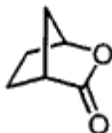
Etapa 1. 6-bromo-2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona



Se añadió gota a gota bromotrimetilsilano (3,1 ml, 0,023 moles) a una disolución de sulfóxido de dimetilo (1,6 ml, 0,023 moles) en cloroformo (38,0 ml) en un matraz redondo a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 0 °C durante 2 horas. A la mezcla de reacción se añadió gota a gota una disolución de ácido ciclopent-3-eno-1-carboxílico (2,00 g, 0,0178 moles) en cloroformo (12 ml) durante un periodo de 15 minutos y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C

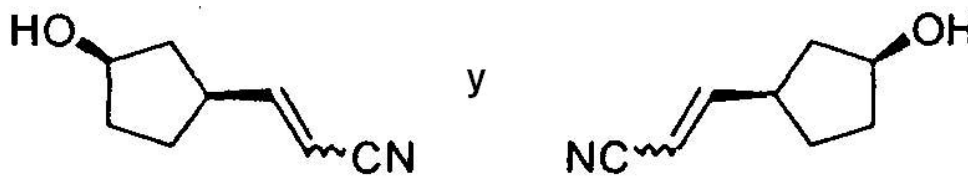
durante 10 minutos. Entonces se añadió N,N-diisopropiletilamina (4,0 ml, 0,023 moles) y la mezcla resultante se agitó a 0 °C. Después de 10 minutos, la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con cloroformo, se lavó con agua, salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se separó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando 30 % de EtOAc/hexanos como eluyente dando el producto. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,88 (s a, 1H), 4,34 (m, 1H), 2,90 (m, 1H), 2,66 (m, 1H), 2,31 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,83 (m, 1H).

*Etapa 2. 2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona*



Se añadió gota a gota tris(trimetilsilil)silano (4,7 ml, 15 mmoles) a una disolución de 6-bromo-2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (1,96 g, 10,3 mmoles) y 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo (0,2 g, 1 mmoles) en tolueno (100 ml) en un matraz redondo y la mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 5 horas. La mezcla de reacción se concentró por evaporación rotatoria y el residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó con NH<sub>4</sub>Cl saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se separó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando 100 % de hexanos, degradando al 25 % de EtOAc/hexanos, luego 33 % de EtOAc/hexanos, como eluyentes dando el producto. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,93 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,60-1,99 (m, 5H).

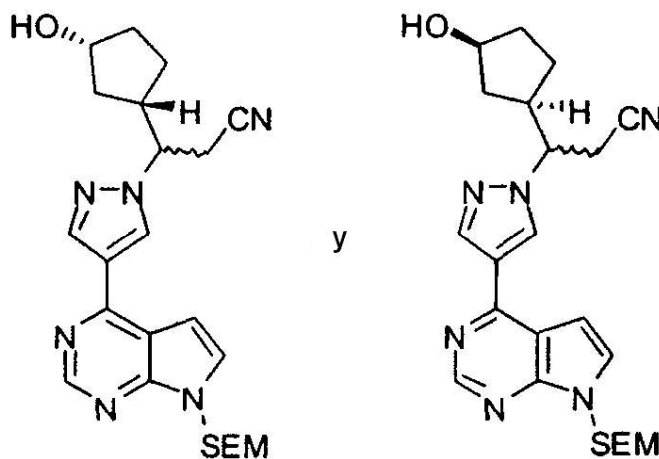
*Etapa 3. (2E)- y (2Z)-3-[(1S,3R)-3-hidrox ciclopentil]acrilonitrilo y (2E)- y (2Z)-3-[(1R,3S)-3-hidrox ciclopentil]acrilonitrilo*



Se añadió gota a gota 1,00 M de hidruro de diisobutilaluminio en tolueno (8,0 ml) a una disolución de 2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (600 mg, 5 mmoles) en cloruro de metileno (20 ml) en un matraz redondo a -78 °C. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 45 minutos. La mezcla de reacción se trató con disolución saturada de sal de Rochelle. Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, NaCl saturado, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se separaron a vacío. El producto en bruto se usó en la siguiente reacción sin más purificación.

Una disolución del 2-oxabicyclo[2.2.1]heptan-3-ol en bruto (400 mg, 4 mmoles) y (trifenilfosforaniliden)acetonitrilo (1,2 g, 3,8 mmoles) en tolueno (12 ml) en un matraz redondo se calentó a 80 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó entonces por cromatografía sobre gel de sílice usando 40 % de EtOAc/hexanos dando los productos racémicos. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,78 (dd, 1H), 5,30 (d, 1H), 5,20 (m, 1H), 2,67 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,40-1,90 (m, 6H).

*Etapa 4. 3-[(1S,3R)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3S)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*



Se añadió 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0,54 ml, 3,6 mmoles) a una disolución de una mezcla de (2E)- y (2Z)-3-[(1S,3R)-3-hidrox ciclopentil]acrilonitrilo y (2E)- y (2Z)-3-[(1R,3S)-3-hidrox ciclopentil]acrilonitrilo (0,250 g, 1,82 mmoles) y 4-(1H-pirazol-4-il)-7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina (0,57 g, 1,8 mmoles) en acetonitrilo (5 ml) en un matraz redondo. La mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 2 días, momento en el que el análisis de CL-EM mostró que ~80 % de los materiales de partida se había consumido. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando 1:1 de EtOAc/hexanos dando el producto. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,90 (d, 1H), 8,39 (m, 2H), 7,46 (m, 1H), 6,86 (m 1H), 5,73 (s, 2H), 4,52 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 3,2 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,3 (m, 1H), 1,30-1,90 (m, 6H), 0,99 (m, 2H), 0,08 (s, 9H). EM/CL: 453 (M+H)<sup>+</sup>.

**Etapa 5.** 3-[(1S,3R)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3S)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo

Se añadió tetrafluoroborato de litio (0,176 g, 1,88 mmoles) a una disolución de 3-[(1S,3R)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3S)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (85,0 mg, 0,188 mmoles) en acetonitrilo (1,5 ml) y agua (0,135 ml) en un vial. La mezcla resultante se calentó a 85 °C durante 26 horas. Después, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C, se añadió etilendiamina (63 µl, 0,94 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se purificó por CL prep. dando el producto como la sal de ácido trifluoroacético. Ésta se disolvió en metanol y se añadió Amberlyst 26. La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía quiral dando 4 picos principales y 4 picos secundarios. (Columna: ChiralPak IA, 4,6 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 0,8 ml/min-analítica; columna: ChiralPak IA, 20 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 12 ml/min-preparativa)

Los picos secundarios se atribuyeron a los ésteres de trifluoroacetato que son muy móviles y se escinden dejándolos estar en metanol a los alcoholes correspondientes.

Pico 1 principal [Tiempo de retención: 18,56 minutos]: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,66 (s a, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,51 (m, 1H), 6,97 (m, 1H), 4,57 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,16 (m, 2H), 2,65 (m, 1H), 1,64-2,00 (m, 5H), 1,28 (m, 1H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

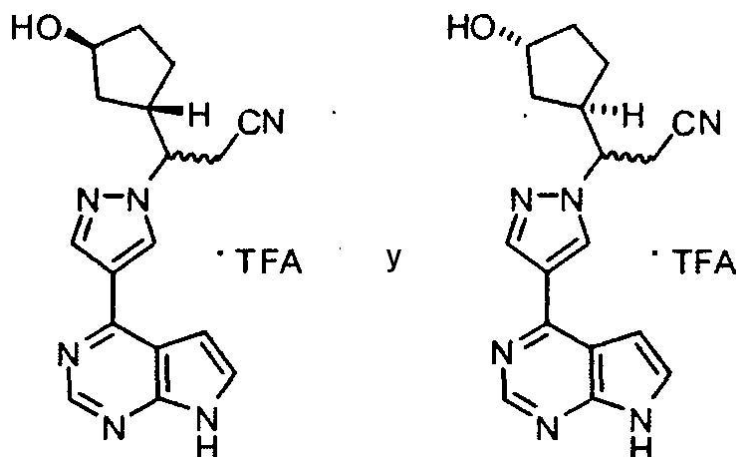
Pico 2 principal [Tiempo de retención: 25,88 minutos]: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,66 (s a, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,50 (m, 1H), 6,96 (m, 1H), 4,60 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 2,61 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 1,40-1,80 (m, 5H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

Pico 3 principal [Tiempo de retención: 39,84 minutos]: RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,66 (s a, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,50 (m, 1H), 6,96 (m, 1H), 4,60 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,18 (m, 2H), 2,61 (m, 1H), 2,23 (m, 1H), 1,40-1,80 (m, 5H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

Pico 4 principal [Tiempo de retención: 51,48 minutos]: RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,66 (s a, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,51 (m, 1H), 6,97 (m, 1H), 4,57 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 3,16 (m, 2H), 2,65 (m, 1H), 1,64-2,00 (m, 5H), 1,28 (m, 1H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

### Ejemplo 2:

Sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1S,3S)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1R,3R)-3-hidrox ciclopentil]-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo



*Etapa 1: benzoato de (1S,3S)-3-{2-ciano-1-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}ciclopentilo y benzoato de (1R,3R)-3-(2-ciano-1-(4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}ciclopentilo*

5 Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,38 ml, 1,9 mmoles) a una disolución de 3-[(1S,3R)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3S)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (0,51 g, 1,9 mmoles) en tetrahidrofurano (5,3 ml) en un matraz redondo a 0 °C. La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos y se añadió ácido benzoico (0,24 g, 1,9 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C  
10 durante 2 horas, momento en el que el análisis por CCF no mostró material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat., agua, NaCl saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se separó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando 20 % de EtOAc/hexanos dando el producto. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,91 (d, 1H), 8,39 (m, 2H), 8,08 (m, 2H), 7,75 (m, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,48 (m, 2H), 7,46 (m, 1H), 6,87 (m 1H), 5,74 (s, 2H), 5,40-5,50 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,07 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 1,30-1,90 (m, 6H), 0,99 (m, 2H), 0,08 (s, 9H). EM/CL: 557 (M+H)<sup>+</sup>.

*Etapa 2: 3-[(1S,3S)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

20 Se añadió hidróxido de litio (22,7 mg, 0,000948 moles) a una disolución de benzoato de (1S,3S)-3-{2-ciano-1-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}ciclopentilo y benzoato de (1R,3R)-3-{2-ciano-1-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]etil}ciclopentilo (440 mg, 0,00079 moles) disuelta en una mezcla de 1,4-dioxano (10,0 ml, 0,128 moles), metanol (4,0 ml, 0,099 moles) y agua (4,0 ml, 0,22 moles) en un matraz redondo. La mezcla resultante se agitó durante 20 horas, momento en el que el análisis de CL-EM no mostró material de partida. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat., agua, NaCl saturado, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se separaron a vacío. El residuo se usó en la siguiente reacción sin más purificación. EM/CL: 453 (M+H)<sup>+</sup>.

30 *Etapa 3: Sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1S,3S)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

35 La mezcla de 3-[(1S,3S)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3R)-3-hidroxiciclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo se desprotegió bajo las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 1, Etapa 5. La mezcla se separó usando CL quiral y se purificó adicionalmente por CL dando los isómeros como las sales de trifluoroacetato. Columna: ChiralPak IA, 4,6 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 0,8 ml/min-analítica; Columna: ChiralPak IA, 20 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 12 ml/min preparativa).

45 Pico 1 [Tiempo de retención: 16,98 minutos]: <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,11 (s a, 1H), 8,07 (s a, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,03 (d, 1H), 6,46 (m, 1H), 3,80 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 2,20 (m, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,29 (m, 1H), 1,20 (m, 1H), 0,60-0,90 (m, 4H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

Pico 2 [Tiempo de retención: 18,68 minutos]: <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,91 (s, 1H), 8,087 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,84 (d, 1H), 7,28 (m, 1H), 4,60 (m, 1H), 4,34 (m, 1H), 3,20 (m, 2H), 2,91 (m, 1H), 1,92 (m, 2H), 1,60 (m, 3H), 1,35 (m, 1H). EM/CL: 323 (M+H)<sup>+</sup>.

50 El pico 3 y el pico 4 eluyeron juntos (23,13 minutos).

55

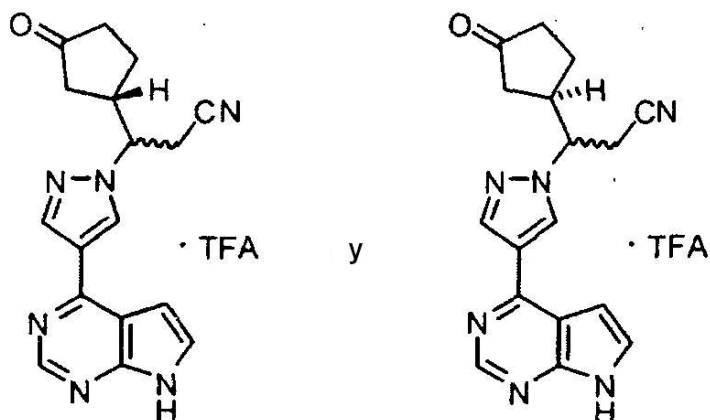
60

65



**Ejemplo 3:**

Sal de trifluoroacetato de 3-[(1S)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1R)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo



*Etapa 1: 3-[(1S)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

Se añadió sulfóxido de dimetilo (0,340 ml, 4,79 mmoles) a una disolución de cloruro de oxalilo (0,20 ml, 2,4 mmoles) en cloruro de metileno (25 ml) a -78 °C en un matraz redondo. La mezcla resultante se agitó a -78 °C durante 15 minutos y se añadió gota a gota una disolución de 3-[(1S,3R)-3-hidroxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R,3S)-3-hidroxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo (0,84 g, 1,8 mmoles) en cloruro de metileno (17 ml). La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 60 minutos y se añadió trietilamina (0,722 ml, 5,18 mmoles). Después de agitar a -78°C durante 60 minutos, la mezcla de reacción se calentó a 0 °C y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua, NaCl saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se separó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando 40 % de EtOAc/hexanos dando el producto. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,91 (m, 1H), 8,40 (d, 1H), 8,38 (s, 1H), 7,47 (m, 1H), 6,85 (t, 1H), 5,74 (s, 2H), 4,51 (m, 1H), 3,60 (t, 2H), 3,00-3,30 (m, 3H), 1,50-2,70 (m, 6H), 0,98 (t, 2H), 0,00 (s, 9H). EM/CL: 451 (M+H)<sup>+</sup>.

*Etapa 2: Sal de trifluoroacetato de 3-[(1S)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y sal de ácido trifluoroacético de 3-[(1R)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo*

La mezcla de 3-[(1S)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo y 3-[(1R)-3-oxociclopentil]-3-[4-(7-[2-(trimetilsilil)etoxi]metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo se desprotegió en condiciones similares al Ejemplo 1, Etapa 5, dando las dos cetonas diaestereoméricas que se separaron por cromatografía quiral y se purificaron por CL dando los diaestereómeros y enantiómeros como las sales de trifluoroacetato. Columna: ChiralPak IA, 4,6 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 0,8 ml/min-analítica; Columna: ChiralPak IA, 20 x 250 mm, partícula de 5 micrómetros. Fase móvil: 30 % de etanol en hexanos. Velocidad de flujo: 12 ml/min preparativa).

Pico 1 [Tiempo de retención: 11,82 minutos].

Pico 2 [Tiempo de retención: 13,94 minutos]: <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10,07 (s a, 1H), 8,79 (s a, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,32 (d, 1H), 6,71 (m, 1H), 4,40 (m, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,97 (m, 2H), 2,00-2,32 (m, 5H), 1,61 (m, 1H). EM/CL: 321 (M+H)<sup>+</sup>.

Pico 3 [Tiempo de retención: 17,61 minutos]: <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10,70 (s a, 1H), 8,83 (s a, 1H), 8,34 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,35 (d, 1H), 6,73 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 2,90 (m, 2H), 2,51 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,84 (m, 1H), 1,60 (m, 1H). EM/CL: 321 (M+H)<sup>+</sup>.

Pico 4 [Tiempo de retención: 20,31 minutos].

**Ejemplo A**

Tabla 2

Compuesto	JAK 1 IC50 (nM)	JAK 2 IC50 (nM)	JAK 3 IC50 (nM)	Fracción libre (% suero humano)	Hintrinseco humano CL (L/h/kg)
Compuesto 1	<10	<10	<10	<5	0.68
Metabolito 1	2.5-12	0.7-2.5	8.3-45	26-35	<0.50
Metabolito 2	3-15	2-2.8	17-30	5-27	<0.50
Metabolito 3	2.7-12	2.1-5.9	11-41	14-56	<0.57

Los metabolitos 1, 2 y 3 se aislaron de orina de rata o perro después de la administración del compuesto 1 a propósito de estudios farmacocinéticos y toxicocinéticos. Los datos de actividad para los metabolitos 1, 2 y 3, junto con la fracción libre y los datos de eliminación intrínseca, se compararon con los del compuesto parental, el compuesto 1. Los ensayos de actividad de JAK, ensayos de fracción libre y ensayos de eliminación intrínseca se describen a continuación. Se obtuvieron puntos de datos para algunos estereoisómeros individuales de los metabolitos 1, 2 y 3, y el intervalo numérico proporcionado anteriormente refleja los mayores y menores valores obtenidos para todos los estereoisómeros probados. Como puede apreciarse en la Tabla 1, los metabolitos son potentes inhibidores de JAK1, JAK2 y JAK3, como el compuesto 1. Sin embargo, las fracciones libres obtenidas para los metabolitos son inesperadamente mayores y la eliminación intrínseca es deseablemente menor que para el compuesto 1.

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

Los compuestos en el presente documento se probaron para actividad inhibidora de dianas JAK según el siguiente ensayo *in vitro* descrito en Park y col., Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104. Los dominios catalíticos de JAK1 humana (a.a. 837-1142), Jak2 (a.a. 828-1132) y Jak3 (a.a. 781-1124) con un marca de His del extremo N se expresaron usando baculovirus en células de insecto y se purificaron. La actividad catalítica de JAK1, JAK2 o JAK3 se ensayó midiendo la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado se detectó por fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea, de homogenous time resolved fluoresce (HTRF). Las  $CI_{50}$  de los compuestos se midieron 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 0,1 mg/ml (0,01 %) de BSA. La concentración de ATP en las reacciones fue 90  $\mu$ M para Jak1, 30  $\mu$ M para Jak2 y 3  $\mu$ M para Jak3. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1 h y luego se detuvieron con 20  $\mu$ l de EDTA 45 mM, SA-APC 300 nM, Eu-Py20 6 nM en tampón de ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). La unión al anticuerpo marcado con europio tuvo lugar durante 40 minutos y la señal de HTRF se midió en un lector de placas Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). Los compuestos que tienen una  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ M o menos para cualquiera de las dianas de JAK anteriormente mencionadas se consideraron activos.

#### Ensayo de fracciones libres

La unión a proteína de un compuesto de prueba se determinó por diálisis en equilibrio usando un sistema Dianorm de Harvard Apparatus (Holliston, MA). La diálisis se realizó a 37 °C durante 2 h en suero humano. Los metabolitos se incubaron a 3  $\mu$ M y el compuesto 1 a 3 y 10  $\mu$ M. Las concentraciones de compuesto en suero y tampón después de la diálisis se determinaron por análisis de EM/CL/EM. La fracción libre se define como la relación de la concentración en tampón frente a en suero.

#### Ensayo de eliminación intrínseca

La eliminación intrínseca se determinó incubando 1  $\mu$ M de compuesto de prueba en microsomas de hígado de género mixto humano (0,5 mg/ml de proteína) a 37 °C en presencia de NADPH 1 mM. La desaparición del compuesto de prueba se monitorizó por EM/CL a 0, 5, 10, 20 y 30 min. La pendiente de declive en la concentración de compuesto se usó para calcular la eliminación intrínseca humana empleando procedimientos convencionales informados en la bibliografía.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de:

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

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10           2. El compuesto de la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que está sustancialmente aislado.

15           3. Una composición que comprende un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de la reivindicación 3 que es adecuada para administración por vía oral.

20           5. Un procedimiento de modular una actividad de JAK que comprende poner en contacto JAK *ex vivo* con un compuesto de la reivindicación 1, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha modulación es inhibidora.

25           7. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente, en el que dicha enfermedad está asociada a actividad de JAK.

8. El compuesto para su uso de la reivindicación 7

- 30           en el que dicha enfermedad es rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto frente a huésped; o  
              en el que dicha enfermedad es una enfermedad autoinmune;  
              en el que dicha enfermedad es un trastorno de la piel; o  
              en el que dicha enfermedad es una enfermedad viral; o  
              en el que dicha enfermedad es cáncer; o  
              en el que dicha enfermedad se caracteriza por una JAK2 mutante; o  
              en el que dicha enfermedad es un trastorno mieloproliferativo; o  
              en el que dicha enfermedad es una enfermedad inflamatoria; o  
              en el que dicha enfermedad es isquemia-reperfusión o relacionada con un evento isquémico; o  
              en el que dicha enfermedad es anorexia o caquexia resultante de o asociada a cáncer; o  
              en el que dicha enfermedad es fatiga resultante de o asociada a cáncer.

40           9. El compuesto para su uso de la reivindicación 8

- 45           en el que dicha enfermedad autoinmune es 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 inmunoglobulina, miocarditis o trastorno de tiroides autoinmune; o  
              en el que dicha enfermedad autoinmune es trastorno de la piel bulloso; o  
              en el que dicho trastorno de la piel es dermatitis atópica, psoriasis, sensibilización de la piel, irritación de la piel, erupción cutánea, dermatitis de contacto o sensibilización por contacto alérgico; o  
              en el que dicha enfermedad viral es virus de Epstein Barr (VEB), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus de la varicela zóster (VVZ) o virus del papiloma humano (VPH); o  
              en el que dicho cáncer es un tumor sólido; o  
              en el que dicho cáncer es hematológico; o  
              en el que dicho cáncer es un cáncer de piel; o  
              en el que al menos una mutación de dicha JAK2 mutante reside en el dominio pseudo-cinasa de dicha JAK2; o  
              en el que dicho trastorno mieloproliferativo (TMP) es policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (SHE) o enfermedad sistémica de mastocitos (ESM); o  
              en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del ojo; o  
              en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias; o  
              en el que dicha enfermedad inflamatoria es una miopatía inflamatoria.

60           10. El compuesto para su uso de la reivindicación 9,

- 65           en el que dicho trastorno de la piel bulloso es pénfigo vulgar (PV) o penfigoide bulloso (PB); o  
              en el que dicho cáncer de tumor sólido es 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; o

en el que dicho cáncer de tumor sólido es cáncer de próstata; o  
en el que dicho cáncer hematológico es linfoma, leucemia o mieloma múltiple; o  
en el que dicho cáncer de piel es linfoma cutáneo de células T o linfoma cutáneo de linfocitos B; o  
en el que dicho cáncer hematológico es mieloma múltiple; o

5 en el que dicha enfermedad inflamatoria del ojo es iritis, uveítis, escleritis o conjuntivitis; o  
en el que dicha enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias se refiere a las vías respiratorias superiores; o  
en el que dicha enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias se refiere a las vías respiratorias inferiores; o  
en el que dicha miopatía inflamatoria es miocarditis.

10 11. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el  
tratamiento de cáncer; artritis reumatoide; cáncer de próstata; psoriasis; mieloma múltiple; metaplasia mieloide con  
mielofibrosis (MMM); policitemia vera (PV); trombocitemia esencial (TE); micosis fungoide; un cáncer hematológico;  
leucemia mielógena crónica (LMC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); o leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

15 12. Un compuesto de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el  
tratamiento de metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM); policitemia vera (PV); o trombocitemia esencial (TE).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65