

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 109**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2009** **E 09786882 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2384326**

54 Título: **Compuestos de pirrolo[2,3-d]pirimidina**

30 Prioridad:

20.08.2008 US 90371 P

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

11.06.2014

73 Titular/es:

**ZOETIS LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park NJ 07932 , US**

72 Inventor/es:

**BERLINSKI, PAMELA JO;
BIRCHMEIER, MATTHEW JOSEPH;
BOWMAN, JERRY WAYNE;
GONZALES, ANDREA JOY;
KAMERLING, STEVEN GLENN;
MANN, DONALD WAYNE y
MITTON-FRY, MARK JOSEPH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 467 109 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

Compuestos de pirrolo[2,3-*d*]pirimidina

Campo de la invención

5 En el presente documento, se describe *N*-metil(4-(metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil) metanosulfonamida, sus análogos, su uso como inhibidores de las Janus quinasas (JAK), composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y procedimientos de preparación de estos compuestos.

Antecedentes de la invención

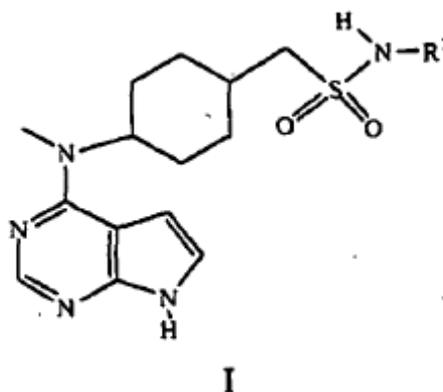
10 Las proteínas quinasas son familias de enzimas que catalizan la fosforilación de restos específicos en las proteínas, y se clasifican en general en tirosina y serina/treonina quinasas. La actividad quinasa inapropiada, que surge de la mutación, sobreexpresión o regulación inapropiada, disregulación o desregulación, así como de la sobre- o sub-producción de factores de crecimiento o citocinas, se ha implicado en muchas enfermedades, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, enfermedades cardiovasculares, alergias, asma y otras enfermedades respiratorias, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades óseas, trastornos metabólicos, y trastornos neurológicos y neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer. La actividad quinasa inapropiada
15 desencadena una variedad de respuestas celulares biológicas relacionadas con el crecimiento celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la apoptosis, la mitogénesis, el control del ciclo celular y la movilidad celular, implicadas en las enfermedades anteriormente mencionadas y enfermedades relacionadas.

20 Por lo tanto, las proteínas quinasas se han convertido en una clase importante de dianas enzimáticas para la intervención terapéutica. En particular, la familia JAK de proteínas celulares tirosina quinasas (JAK-1, JAK-2, JAK-3 y Tyk-2) desempeña un papel central en la señalización de las citocinas (Kisseleva *et al.*, "Gene", 2002, 285, 1; Yamaoka *et al.* "Genome Biology" 2004, 5, 253)). Tras la unión a sus receptores, las citocinas activan las JAK que, seguidamente, fosforilan el receptor de citocinas, creando de este modo sitios de acoplamiento para las moléculas de señalización, en particular, los miembros de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) que, en última instancia, conducen a la expresión génica. Se conocen numerosas citocinas que activan la familia JAK.
25

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de compuestos alternativos que inhiban eficazmente las enzimas JAK, incluyendo JAK-1, JAK-2, JAK-3 y/o Tyk-2.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es hidrocarburo (C₁₋₄) monovalente saturado lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con hidroxilo.

Específicamente, un compuesto de fórmula I, en la que R¹ es metilo.

Específicamente, un compuesto de fórmula I, en la que R¹ es etilo o ciclobutilo.

35 En otros aspectos, la presente invención también proporciona:

composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de fórmula I; combinaciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, uno o más agentes adicionales que modulan un sistema inmune de mamífero o con agentes antiinflamatorios, y un compuesto de fórmula I; compuestos de fórmula I para su uso en terapia, más concretamente, para su uso en el tratamiento de

reacciones alérgicas, dermatitis alérgicas, dermatitis atópicas, eczema, prurito, cánceres, leucemia, lupus y mieloma múltiple en un mamífero; Forma cristalina A del compuesto de fórmula I que es sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-(4-(metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil)metanosulfonamida*; y un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I que es sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-(4-(metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil)metanosulfonamida*.

También se describen en el presente documento:

procedimientos para el control o el tratamiento de un trastorno o una afección seleccionado de entre rechazo de trasplante de órgano, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, cáncer, osteoartritis y diabetes mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

procedimientos para el control o el tratamiento de un trastorno o una afección seleccionado de entre diabetes, cáncer, trastornos autoinmunes del tiroides, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, sequedad ocular, enfermedad de Alzheimer, leucemia y otras indicaciones en las que sería deseable la inmunosupresión o la inmunomodulación mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

procedimientos para el control o el tratamiento de un trastorno o una afección seleccionado de entre reacción alérgica incluyendo dermatitis alérgica, eczema, dermatitis atópica, prurito y otras afecciones pruriginosas y enfermedad inflamatoria tal como la enfermedad intestinal en mamíferos mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

procedimientos para el control o el tratamiento de un trastorno o una afección seleccionado de entre asma y otras enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, incluyendo asma crónico o inveterado, asma tardío, hipersensibilidad de las vías respiratorias, bronquitis, asma bronquial, asma alérgico, asma intrínseco, asma extrínseco, asma por polvo, obstrucción recurrente de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar de obstrucción crónica mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

procedimientos para la inhibición de proteínas tirosina quinasas o JAK-1, JAK-2, JAK-3 y/o Tyk-2 mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente sal aceptable del mismo;

procedimientos para la inhibición de proteínas tirosina quinasas o JAK-1, JAK-2, JAK-3 y/o Tyk-2 mediante la administración a un mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente sal aceptable del mismo; y

procedimientos para la preparación de los compuestos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un patrón de difracción de rayos X en polvo característico de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-(4-(metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil)metanosulfonamida* (Forma A).

La Fig. 2 ilustra las puntuaciones de VAS del día 27 para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a pulgas en el ensayo de reducción del prurito y la dermatitis asociados con pulgas.

La Fig. 3 ilustra los segundos de prurito por registro de 4 horas para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a pulgas en el ensayo de reducción del prurito y la dermatitis asociados con pulgas.

Descripción detallada

Con respecto al compuesto anterior, y a lo largo de toda la solicitud y las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los significados definidos a continuación.

El término "mamífero" se refiere a seres humanos o animales incluyendo el ganado y los animales de compañía. La expresión "animal de compañía" o "animales de compañía" se refiere a los animales que se cuidan como mascotas. Los ejemplos de los animales de compañía incluyen gatos, perros y caballos. El término "ganado" se refiere a los animales criados en un entorno agrícola para fabricar productos tales como alimentos o fibra, o por su trabajo. En algunas realizaciones, el ganado es adecuado para ser consumido por mamíferos, por ejemplo, por los seres humanos. Los ejemplos de animales de ganado incluyen mamíferos tales como vacas, cabras, caballos, cerdos, ovejas, incluyendo corderos y conejos, así como aves tales como pollos, patos y pavos.

El término "controlar", "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas o signos clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un mamífero que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o muestra síntomas/signos de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o de sus síntomas/signos clínicos; o

(3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o de sus síntomas/signos clínicos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, etc., del mamífero que se vaya a tratar.

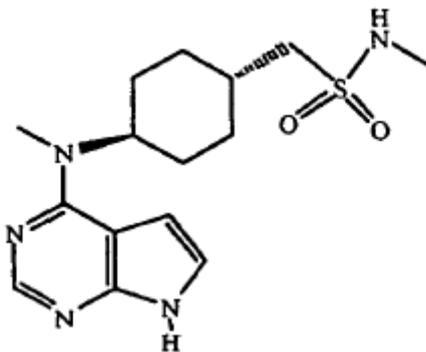
El término "aproximadamente", si se usa en la definición de un pico de un patrón de difracción de rayos X en polvo, se define como el valor 2-theta indicado $\pm 0,2$ grados 2-theta. Cualquier determinación de si una forma cristalina es la forma A polimorfa y está englobada por las reivindicaciones debe interpretarse a la luz de la variabilidad en este ensayo.

"Farmacéuticamente aceptable" significa adecuado para su uso en mamíferos, animales de compañía o animales de ganado.

El contenido de átomos de carbono de diversos restos que contienen hidrocarburos se indica por un prefijo que indica el número mínimo y máximo de átomos de carbono del resto, es decir, el prefijo C_{i-j} indica un resto del número entero "i" al número entero j de átomos de carbono, ambos inclusive. Así pues, por ejemplo, alquilo C₁₋₄ se refiere a alquilo de uno a cuatro átomos de carbono, ambos inclusive.

El término alquilo se refiere a grupos hidrocarburo monovalentes saturados lineales, ramificados y cíclicos, pero la referencia a un radical individual tal como "propilo" solo engloba el radical de cadena lineal, un isómero de cadena ramificada tal como "isopropilo" o un isómero cíclico tal como ciclopropilmetilo o ciclopentilo al que se hace referencia concretamente.

Los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de unión de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros". Los expertos en la materia apreciarán que el compuesto de fórmula I puede existir como diastereómeros aquirales *cis* y *trans*. En concreto, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula IA que tiene el nombre químico *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida,



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se incluyen dentro del alcance de los compuestos descritos todos los isómeros (por ejemplo, *cis*, *trans* o diastereómeros) de los compuestos descritos en el presente documento, solos, así como cualquier mezcla. Todas estas formas, incluyendo enantiómeros, diastereómeros, *cis*, *trans*, sin, anti, solvatos (incluyendo hidratos), tautómeros y sus mezclas, se incluyen en los compuestos descritos.

Las mezclas estereoisoméricas, por ejemplo, las mezclas de diastereómeros, se pueden separar en sus isómeros correspondientes de una forma conocida por medio de procedimientos de separación adecuados. Las mezclas diastereoméricas, por ejemplo, se pueden separar en sus diastereómeros individuales por medio de cristalización fraccionada, cromatografía, distribución de disolvente y procedimientos similares. Esta separación puede tener lugar bien a nivel de uno de los compuestos de partida o en un compuesto de fórmula I en sí. Los enantiómeros se pueden separar a través de la formación de sales diastereoméricas, por ejemplo, mediante la formación de una sal con un ácido quiral enantiómero puro, o por medio de cromatografía, por ejemplo, mediante CLAR, usando sustratos cromatográficos con ligandos quirales.

Vías de administración

En el uso terapéutico para el tratamiento de trastornos en un mamífero (es decir seres humanos y animales), un compuesto de la presente invención o sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, parenteral, tópica, rectal, transmucosa o intestinal. Las administraciones parenterales incluyen inyecciones indirectas

para generar un efecto sistémico o inyecciones directas en la zona afectada. Las administraciones tópicas incluyen el tratamiento de la piel o de órganos fácilmente accesibles por aplicación local, por ejemplo, los ojos o los oídos. También incluye la administración transdérmica para generar un efecto sistémico. La administración rectal incluye la forma de supositorios. Las vías de administración preferidas son la vía oral y parenteral.

5 Sales farmacéuticas

El compuesto de fórmula I se puede usar en su forma nativa o en forma de sal. En los casos en que se desea la formación de una sal de ácido o de base no tóxica estable, puede ser apropiada la administración del compuesto en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I incluyen las sales acetato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, edisilato, etoglutarato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, glicerofosfato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato de hidrógeno/fosfato de dihidrógeno, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato.

15 Composición/formulación

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento, liofilización o secado por pulverización.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprendan excipientes y adyuvantes que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada. Los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos para los expertos en la materia y, por lo tanto, se incluyen en la presente invención. Dichos excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991).

Las formulaciones de la invención se pueden diseñar para que sean de corta acción, de liberación rápida, de acción prolongada y de liberación sostenida. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas también se pueden formular para una liberación controlada o para una liberación lenta.

Dosis

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad suficiente para conseguir el objetivo pretendido, es decir, el control o el tratamiento de trastornos o enfermedades. Más concretamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas/signos de una enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La cantidad de componente activo, que es el compuesto de la presente invención, en la composición farmacéutica y forma de dosificación unitaria de la misma, se puede variar o ajustar ampliamente dependiendo de la manera de administración, la potencia del compuesto en particular y la concentración deseada. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la materia. En general, la cantidad de componente activo variará del 0,01 % al 99 % en peso de la composición.

En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de dosis de componente activo estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, más preferentemente de aproximadamente 0,3 a 3 mg/kg de peso corporal/día, aún más preferentemente de aproximadamente 0,3 a 1,5 mg/kg de peso corporal/día. Se ha de entender que las dosis pueden variar dependiendo de las necesidades de cada sujeto y de la gravedad de los trastornos o las enfermedades que se estén tratando.

La dosis deseada se puede presentar convenientemente en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en un número de administraciones diferenciadas libremente espaciadas; tales como múltiples inhalaciones de un insuflador o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Además, se ha de entender que es posible aumentar la dosis inicial administrada más allá del nivel superior anterior con el fin de alcanzarse rápidamente la concentración plasmática deseada. Por otra parte, la dosis inicial puede ser inferior a la óptima y la dosis diaria se puede aumentar progresivamente en el transcurso del tratamiento dependiendo de cada situación. Si se desea, la dosis diaria también se puede dividir en múltiples dosis para la administración, por ejemplo, dos a cuatro veces por día.

55

Usos médicos y veterinarios

Los compuestos de la presente invención son inhibidores de las Janus quinasa (JAK-i) con eficacia contra la Janus quinasa-1 (JAK-1), la Janus quinasa-2 (JAK-2) y la Janus quinasa-3 (JAK-3). Por consiguiente, son útiles como agentes terapéuticos para los trasplantes de órganos, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes de tipo I y complicaciones de la diabetes, cáncer, asma, dermatitis atópica, trastornos autoinmunes del tiroides, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Alzheimer, leucemia, osteoartritis, control del prurito, enfermedad respiratoria crónica y otras indicaciones en las que la inmunosupresión/inmunomodulación sería deseable.

Además, existe una gran necesidad de agentes seguros y eficaces para controlar la dermatitis atópica en los animales. El mercado para el tratamiento de la dermatitis atópica en los animales está dominado actualmente por los corticosteroides, que provocan efectos secundarios dolorosos y no deseables en animales, concretamente en los animales de compañía tales como los perros. También se usan los antihistamínicos, pero son poco eficaces. Actualmente, se comercializa una formulación canina de ciclosporina (ATOPICA™) para la dermatitis atópica, pero es cara y tiene un inicio lento de su eficacia. Además, hay problemas de tolerancia GI con ATOPICA™. Los compuestos de la presente invención son inhibidores de JAK con eficacia contra JAK-1 y JAK-3. Estos compuestos serán una alternativa al uso de esteroides y proporcionarán una solución para el prurito crónico y la inflamación que bien persistirían en dermatitis atópica o experimentarían un retroceso lento tras la eliminación del alérgeno o el agente causante, tal como las pulgas en la dermatitis alérgica de pulgas.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una forma farmacéuticamente aceptable, bien solos o en combinación con uno o más agentes adicionales que modulen un sistema inmune de mamífero o con agentes antiinflamatorios. Estos agentes pueden incluir, pero sin limitación, la ciclosporina A (por ejemplo, Sandimmune.RTM. o Neoral.RTM.), rapamicina, FK-506 (tacrolimus), leflunomida, desoxispergualina, micofenolato (por ejemplo, Cellcept.RTM.), azatioprina (por ejemplo, Imuran.RTM.), daclizumab (por ejemplo, Zenapax.RTM.), OKT3 (por ejemplo, Orthocolone.RTM.), AtGam, aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, naproxeno, piroxicam y esteroides antiinflamatorios (por ejemplo, prednisolona o dexametasona). Estos agentes se pueden administrar como parte de una misma forma de dosificación o en formas de dosificación separadas, por las mismas o diferentes vías de administración, y en las mismas o diferentes pautas de administración según la práctica farmacéutica convencional conocida para un experto en la materia.

En una realización, la invención proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o trastorno asociado con JAK en un sujeto, tal como un ser humano o un animal mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más compuestos descritos en el presente documento al sujeto. La enfermedad, afección o trastorno asociado a JAK puede estar relacionada con JAK-1, JAK-2, JAK-3 y/o Tyk-2. Los sujetos adecuados que se pueden tratar incluyen animales domésticos o salvajes, animales de compañía tales como perros, gatos, caballos y similares; ganado incluyendo vacas y otros rumiantes, cerdos, aves de corral, conejos y similares; primates, por ejemplo, monos tales como monos rhesus y cynomolgus (también conocidos como macaco cangrejero o de larga cola), monos títies, tamarinos, chimpancés, macacos y similares; y roedores tales como ratas, ratones, jerbos, cobayas y similares. En una realización, el compuesto se administra en una forma farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La señalización de JAK/STAT se ha implicado en la mediación de muchas respuestas inmunes anormales tales como alergias, asma, enfermedades autoinmunes tales como rechazo a trasplantes (aloinjertos), artritis reumatoide, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple, así como en neoplasias malignas sólidas y hematológicas tales como leucemia y linfomas. Para una revisión de la intervención farmacéutica de la vía de JAK/STAT, véase Frank, (1999), *Mol. Med.* 5:432-456 y Seidel *et al.*, (2000), *Oncogene* 19:2645-2656.

JAK-3, en particular, se ha implicado en una variedad de procesos biológicos. Por ejemplo, la proliferación y la supervivencia de mastocitos murinos inducida por la IL-4 y IL-9 han demostrado ser dependientes de la señalización de JAK-3 y cadenas γ . Suzuki *et al.*, (2000), *Blood* 96:2172-2180. JAK-3 también desempeña un papel crucial en las respuestas de desgranulación de los mastocitos mediadas por el receptor de IgE (Malaviya *et al.*, (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:807-813), y la inhibición de la JAK-3 quinasa ha demostrado prevenir reacciones de hipersensibilidad de tipo I, incluyendo anafilaxis (Malaviya *et al.*, (1999), *J. Biol. Chem.* 274:27028-27038). La inhibición de JAK-3 también ha demostrado producir la supresión inmune para el rechazo de aloinjertos (Kirken, (2001), *Transpl. Proc.* 33:3268-3270). Las JAK-3 quinasa también han estado implicadas en el mecanismo que participa en las etapas temprana y tardía de la artritis reumatoide (Muller-Ladner *et al.*, (2000), *J. Immunol* 164:3894-3901); la esclerosis lateral amiotrófica familiar (Trieu *et al.*, (2000), *Biochem Biophys. Res. Commun.* 267:22-25); leucemia (Sudbeck *et al.*, (1999), *Clin. Cancer Res.* 5:1569-1582); micosis fungoides, una forma de linfoma de linfocitos T (Nielsen *et al.*, (1997), *Prac. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94:6764-6769); y el crecimiento celular anómalo (Yu *et al.*, (1997), *J. Immunol.* 159:5206-5210; Catlett-Falcone *et al.*, (1999), *Immunity* 10:105-115).

Las JAK quinasa, incluyendo JAK-3, se expresan en abundancia en las células leucémicas primarias de niños con leucemia linfoblástica aguda, la forma más común de cáncer en la infancia, y hay estudios que correlacionan la activación de STAT en ciertas células con señales de regulación de la apoptosis (Demoulin *et al.*, (1996), *Mol. Cell. Biol.* 16:4710-6; Jurlander *et al.*, (1997), *Blood* 89:4146-52; Kaneko *et al.*, (1997), *Clin. Exp. Immun.* 109:185-193; y

Nakamura *et al.*, (1996), *J. Biol. Chem.* 271: 19483-8). También se sabe que son importantes para la diferenciación, función y supervivencia de los linfocitos. JAK-3, en particular, desempeña un papel esencial en la función de los linfocitos, macrófagos y mastocitos. Dada la importancia de esta JAK quinasa, los compuestos que modulan la vía de JAK, incluyendo aquellos que son selectivos de JAK-3, pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades o afecciones en las que está implicada la función de los linfocitos, macrófagos o mastocitos (Kudlacz *et al.*, (2004) *Am. J. Transplant* 4:51-57; Changelian (2003), *Science* 302:875-878).

Las afecciones en las que se contempla que la dirección de la vía de JAK o la modulación de las JAK quinastas, en particular JAK-3, son terapéuticamente útiles incluyen artritis, asma, enfermedades autoinmunes, cánceres o tumores, diabetes, ciertas enfermedades, trastornos o afecciones oculares, inflamación, inflamaciones, alergias o afecciones intestinales, enfermedades neurodegenerativas, psoriasis, rechazo de trasplantes e infección viral. Las afecciones que pueden beneficiarse de la inhibición de JAK-3 se tratan en mayor detalle más adelante.

Por consiguiente, el compuesto de fórmula I o sus sales farmacéuticamente aceptables y las composiciones farmacéuticas se pueden usar para tratar una variedad de afecciones o enfermedades tales como:

artritis, incluyendo artritis reumatoide, artritis juvenil y artritis psoriática;

asma y otras enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, incluyendo asma crónico o inveterado, asma tardío, hipersensibilidad de las vías respiratorias, bronquitis, asma bronquial, asma alérgico, asma intrínseco, asma extrínseco, asma por polvo, obstrucción de las vías respiratorias recurrentes y enfermedad pulmonar de obstrucción crónica;

enfermedades o trastornos autoinmunes tales como los designados como trastornos autoinmunes de un solo órgano o individuales de tipo celular, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica autoinmune, gastritis atrófica autoinmune de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmune, orquitis autoinmune, enfermedad de Goodpasture, trombocitopenia autoinmune, oftalmia simpática, miastenia gravis, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, hepatitis agresiva crónica, colitis ulcerosa y glomerulopatía membranosa, aquellos que incluyen un trastorno sistémico autoinmune, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, síndrome de Reiter, polimiositis-dermatomiositis, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, esclerosis múltiple y penfigoide ampolloso, y enfermedades autoinmunes adicionales, que pueden estar basadas en linfocitos O (humoral) o en linfocitos T, incluyendo el síndrome de Cogan, espondilitis anquilosante, granulomatosis de Wegener, alopecia autoinmune, diabetes juvenil o de tipo I y tiroiditis;

cánceres o tumores, incluyendo el cáncer del tracto alimentario/gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de piel, incluyendo tumores de mastocitos y carcinoma de células escamosas, cáncer de pecho y de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfoma, leucemia, incluyendo leucemia mielógena aguda y leucemia mielógena crónica, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de músculo, cáncer de hueso, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, melanoma incluyendo melanoma oral y metastásico, sarcoma de Kaposi, mielomas incluyendo mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, retinopatía diabética proliferativa y trastornos angiogénicos asociados incluyendo tumores sólidos;

diabetes, incluyendo la diabetes de tipo I y complicaciones de la diabetes;

enfermedades, trastornos o afecciones oculares, incluyendo las enfermedades autoinmunes del ojo, queratoconjuntivitis, conjuntivitis vernal, uveítis incluyendo uveítis asociada con la enfermedad de Behcet y uveítis inducida por el cristalino, queratitis, queratitis herpética, queratitis cónica, distrofia epitelial de la córnea, queratoleucoma, prempihigus ocular, úlcera de Mooren, escleritis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, queratoconjuntivitis seca (ojo seco), flictenula, iridociclitis, sarcoidosis, oftalmopatía endocrina, oftalmitis simpática, conjuntivitis alérgica y neovascularización ocular;

inflamaciones, alergias o afecciones intestinales incluyendo la enfermedad de Crohn y/o colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedades celíacas, proctitis, gastroenteritis eosinofílica y mastocitosis;

enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de las neuronas motoras, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, isquemia cerebral o enfermedad neurodegenerativa causada por lesión traumática, apoplejía, neurotoxicidad del glutamato o hipoxia; lesión isquémica/reperusión en apoplejía, isquemia de miocardio, isquemia renal, ataques al corazón, hipertrofia cardíaca, aterosclerosis y arteriosclerosis, hipoxia de órganos y agregación plaquetaria;

enfermedades, afecciones o trastornos de la piel, incluyendo dermatitis atópica, eczema, psoriasis, esclerodermia, prurito y otras afecciones pruriginosas;

reacciones alérgicas incluyendo dermatitis alérgica en mamíferos incluyendo enfermedades alérgicas equinas tales como hipersensibilidad a picaduras, eczema de verano y picazón en caballos.

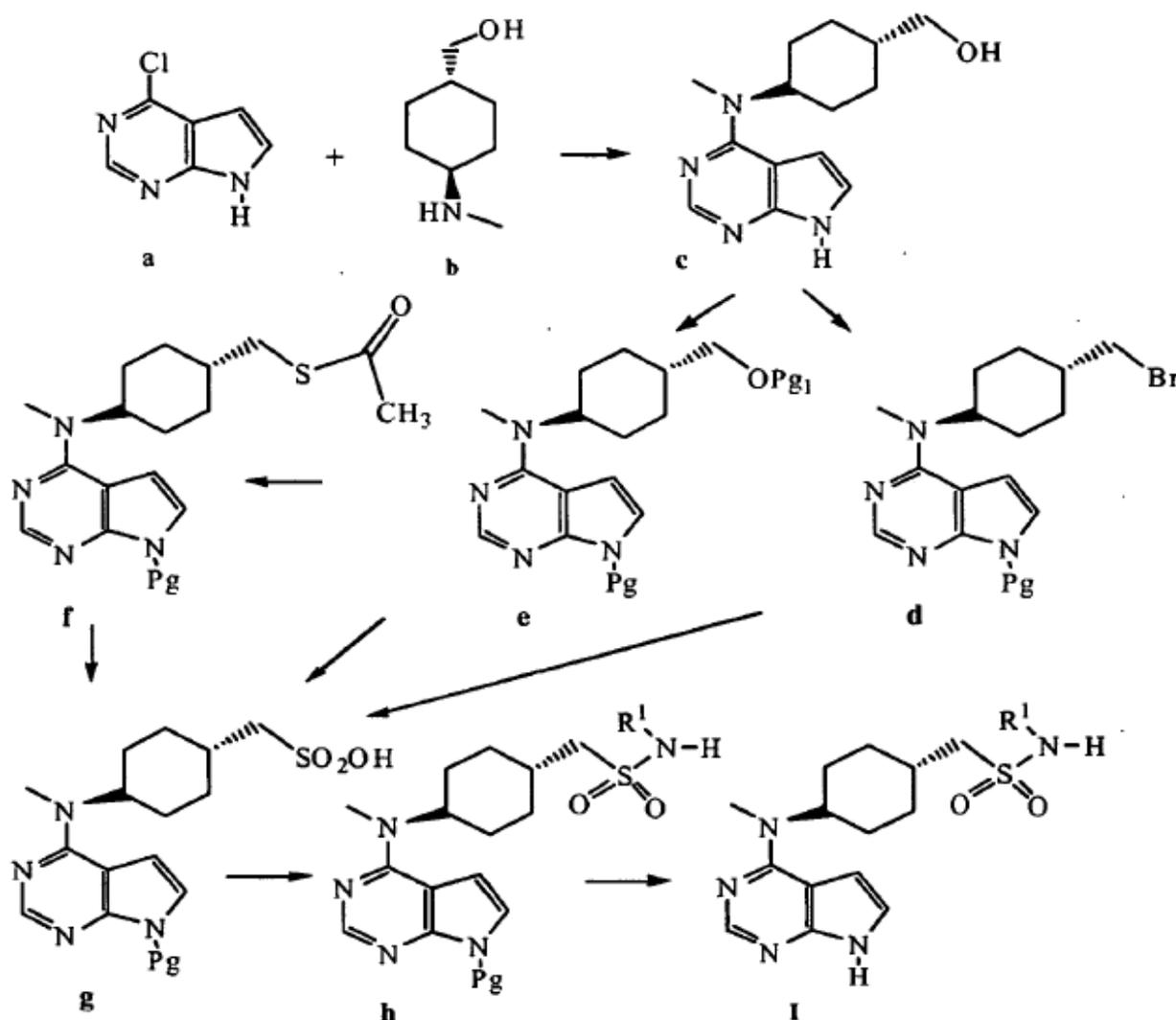
rechazo de trasplantes, incluyendo el rechazo de trasplante de islotes de páncreas, rechazo de trasplante de médula ósea, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos y de células, tales como médula

ósea, cartílago, córnea, corazón, disco intervertebral, islotes, riñones, extremidades, hígado, pulmón, músculo, mioblastos, nervio, páncreas, piel, intestino delgado o tráquea, y trasplante de xeno.

Otra realización proporciona un procedimiento para inhibir una enzima JAK, incluyendo JAK-1, JAK-2, JAK-3 y/o Tyk-2, que incluye poner en contacto la enzima JAK bien con una cantidad no terapéutica o con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los presentes compuestos. Dichos procedimientos se pueden producir *in vivo* o *in vitro*. El contacto *in vitro* puede implicar un ensayo de detección para determinar la eficacia del uno o más compuestos contra una enzima seleccionada en diversas cantidades o concentraciones. El contacto *in vivo* con una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos puede implicar el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección descrita, o la profilaxis del rechazo de trasplante de órgano en el animal en el que se produce el contacto. El efecto del uno o más compuestos sobre la enzima JAK y/o animal huésped también se puede determinar o medir. Los procedimientos para determinar la actividad de JAK incluyen los descritos en los Ejemplos, así como los descritos en los documentos WO 99/65908, WO 99/65909, WO 01/42246, WO 02/00661, WO 02/096909, WO 2004/046112 o WO 2007/012953.

Los siguientes esquemas de reacción ilustran los procedimientos sintéticos generales de los compuestos de la presente invención. Todos los materiales de partida se preparan mediante los procedimientos descritos en estos esquemas o mediante procedimientos conocidos para un experto habitual en la materia.

Esquema I



Será evidente para los expertos en la materia que puede ser necesario proteger y desproteger los grupos funcionales sensibles (Pg o Pg₁) durante la síntesis de un compuesto de la invención. Esto se puede lograr mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, como se describe en "Protective Groups in Organic Synthesis" por T. W. Greene y P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons Inc (1999) y las referencias del mismo.

En el Esquema I, la 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (**a**) se puede obtener a nivel comercial. El *trans*-4-(metilamino)-ciclohexil]metanol (**b**) se puede obtener a partir del correspondiente ácido carboxílico, ácido *trans*-4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]ciclohexanocarboxílico, tras el tratamiento con un agente reductor tal como hidruro de litio y aluminio en un disolvente anhidro aprótico, tal como tetrahidrofurano a temperaturas entre 0-60 °C durante varias horas.

Como se muestra en el Esquema I, se pueden sintetizar un compuesto de estructura (**c**) mediante la reacción de 4-cloro-7H-pirrolo [2,3-d]pirimidina (**a**) con *trans*-4-(metilamino)-ciclohexil]metanol (**b**) en un disolvente polar aprótico adecuado, tal como *N,N*-dimetilformamida, dioxano acuoso y dimetilsulfóxido, en presencia de una base adecuada tal como trietilamina y carbonato de potasio a temperaturas elevadas de hasta 90 °C durante un máximo de unas cuantas horas.

Se podría sintetizar un compuesto de estructura (**d**) en un procedimiento de dos etapas a partir de un compuesto de estructura (**c**). Por ejemplo, se sintetizaría un compuesto de estructura (**d**), en primer lugar, mediante el uso de reactivos de bromación tales como bromuro de tionilo o tribromuro de fósforo en un disolvente polar aprótico tal como cloruro de metileno, proporcionando el bromuro de ciclohexilmetilo sin protección, y en segundo lugar, mediante la adición de un reactivo protector adecuado tal como cloruro de tosilo, dando el compuesto protegido de estructura (**d**).

Se puede preparar un compuesto de estructura (**e**) mediante el uso de procedimientos de protección sencillos a partir de un compuesto de estructura (**c**). Por ejemplo, cuando Pg y Pg₁ son ambos tosilo, esto se puede llevar a cabo en una reacción de una etapa mediante el tratamiento del compuesto no protegido de estructura (**c**) con cloruro de tosilo en presencia de un disolvente polar aprótico tal como cloruro de metileno, un catalizador tal como DMAP y una base débil tal como trietilamina.

Se puede sintetizar un compuesto de estructura (**f**) a partir de un compuesto de estructura (**e**) por S-alquilación usando un nucleófilo adecuado. Por lo tanto, los compuestos de estructura (**e**) en la que el grupo protector (Pg₁) es un grupo protector de hidroxilo adecuado, tal como tosilo o mesilo, se pueden hacer reaccionar con tioacetato de potasio en un disolvente polar tal como dimetilsulfóxido o *N*-metilpirrolidina a temperaturas elevadas de hasta 75 °C durante un máximo de 2 horas, dando compuestos de estructura (**f**).

Se puede sintetizar un compuesto de estructura (**g**) mediante un procedimiento de oxidación a partir de compuestos de fórmula (**f**). Los expertos en la materia conocen muchas condiciones oxidantes, por ejemplo, las descritas en "Handbook of Reagents for Organic Synthesis-Oxidising and Reducing Agents" editado por S. D. Burke y R. L. Danheiser. Por ejemplo, se puede tratar un compuesto de estructura (**f**), opcionalmente humedecido con agua, con ácido fórmico, seguido de la adición lenta de peróxido de hidrógeno mientras se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 horas, dando un compuesto de estructura (**g**). Como alternativa, se puede emplear oxona en un disolvente polar tal como ácido acético, y si la reacción se realiza en presencia de acetato de potasio, se produce la sal de potasio del compuesto de fórmula (**g**).

Se prevé que un compuesto de estructura (**g**) se pueda sintetizar directamente a partir de un compuesto de estructura (**e**) tras el tratamiento con un nucleófilo de azufre adecuado, tal como sulfito de sodio en un disolvente polar. Del mismo modo, un compuesto de estructura (**g**) se podría sintetizar a partir de un compuesto de estructura (**d**) tras la sustitución nucleófila con sulfito de sodio.

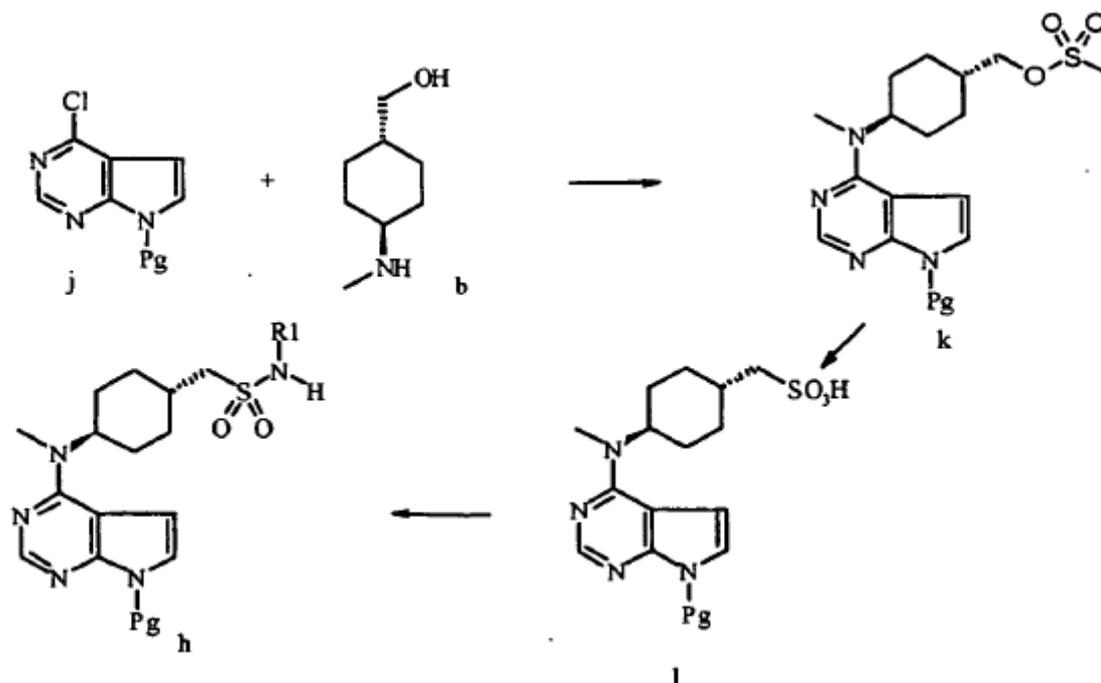
El tratamiento de los ácidos sulfónicos de fórmula (**g**) con un agente de cloración tal como cloruro de tionilo en un disolvente polar aprótico, tal como cloruro de metileno, con un codisolvente polar, tal como *N,N*-dimetilformamida a reflujo da los compuestos clorados. Entonces, el compuesto clorado reacciona en un disolvente anhidro aprótico, tal como tetrahidrofurano, con aminas adecuadas en forma gaseosa pura, o se disuelve en disolventes anhidros apróticos, tales como tetrahidrofurano, a temperatura ambiente, produciendo un compuesto de estructura (**h**). Opcionalmente, se puede usar una base débil anhidra, tal como trietilamina para limpiar el ácido clorhídrico generado en la reacción.

Los compuestos de fórmula I de la presente invención se pueden preparar a partir de compuestos de fórmula (**h**), en la que Pg es un grupo protector adecuado mediante procedimientos de desprotección conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, cuando el grupo protector (Pg) es tosilo, las condiciones de desprotección adecuadas implican la reacción con una base tal como hidróxido de litio o hidróxido de potasio en un disolvente aprótico tal como metanol o isopropanol y, opcionalmente, codisolventes miscibles tales como tetrahidrofurano y agua a temperatura ambiente durante varias horas, produciendo la amina desprotegida de fórmula I.

Las sales de los compuestos de fórmula I se pueden formar mediante la reacción de la base libre de los compuestos de fórmula I con un ácido adecuado, tal como ácido maleico, en presencia de un disolvente aprótico tal como butanol y, opcionalmente, un codisolvente tal como agua.

Como alternativa, los compuestos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema II.

Esquema II



5 En el Esquema II, la 4-metil-7-[(4-metilfenil)sulfonyl]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (**j**) se puede obtener a partir de (a) disponible en el mercado usando un agente protector tal como cloruro de tosilato mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El *trans*-4-(metilamino)-ciclohexil]metanol (**b**) se puede obtener a partir del correspondiente ácido carboxílico, ácido *trans*-4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]ciclohexanocarboxílico, tras el tratamiento con un agente reductor tal como Vitride en un disolvente anhidro, tal como tolueno a temperaturas entre 0-110 °C durante varias horas.

10 Como se muestra en el Esquema II, se puede sintetizar un compuesto de estructura (**k**) mediante la reacción de 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (**j**) con *trans*-4-(metilamino)-ciclohexil]metanol (**b**) en un disolvente adecuado tal como acetona, en presencia de una base adecuada tal como trietilamina con una cantidad catalítica de yoduro de potasio a temperaturas elevadas de hasta 60 °C durante un máximo de unas cuantas horas.

15 Se podría sintetizar un compuesto de la estructura (**k**) mediante la adición de un reactivo de mesilación adecuado tal como cloruro de mesilo en presencia de una base adecuada tal como trietilamina o dietilisopropilamina en un disolvente adecuado tal como acetona a temperaturas elevadas de hasta 60 °C, dando el compuesto de metanosulfonyl de estructura (**k**).

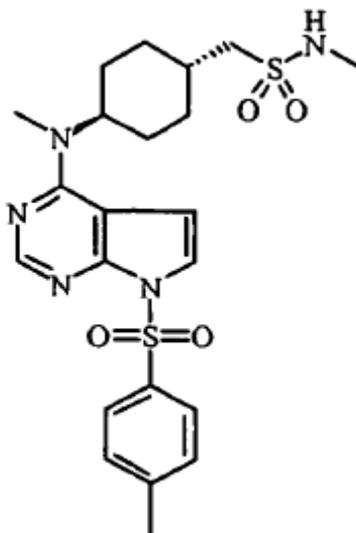
20 Se puede preparar un compuesto de estructura (**l**) mediante el uso de procedimientos de S-alkilación sencillos a partir de un compuesto de estructura (**k**) usando un nucleófilo adecuado. Por lo tanto, los compuestos de estructura (**k**) se pueden hacer reaccionar con sulfito de sodio en un disolvente tal como alcohol isopropílico o agua o tolueno a temperaturas elevadas de hasta 90 °C durante hasta 4 horas, dando compuestos de estructura (**l**).

25 El tratamiento de los ácidos sulfónicos de fórmula (**l**) con un agente de cloración, tal como cloruro de tionilo, en un disolvente polar aprótico, tal como THF o cloruro de metileno, con un codisolvente polar tal como *N,N*-dimetilformamida a temperaturas entre 0 y 40 °C da los compuestos clorados. A continuación, el compuesto clorado reacciona en un disolvente anhidro aprótico, tal como tetrahidrofurano, con aminas adecuadas, tales como metilamina, ciclobutilamina o 2-hidroxiacetidina, preferentemente en forma gaseosa pura, o se disuelve en disolventes anhidros apróticos tales como tetrahidrofurano, a temperatura ambiente, produciendo un compuesto de estructura (**h**). Opcionalmente, se puede usar una base débil anhidra, tal como trietilamina, para limpiar el ácido clorhídrico generado en la reacción.

30

Ejemplos

Preparación 1: *N*-metil-1-[*trans*-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonyl]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil] metanosulfonamida



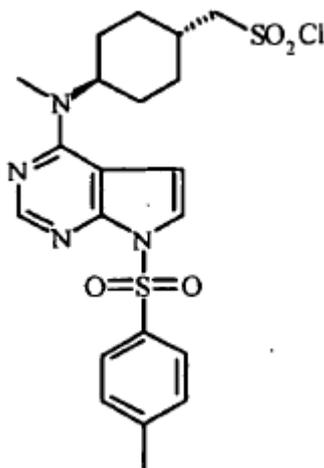
- 5 Procedimiento (a). A una solución del compuesto de la Preparación 2 (308,0 g de peso húmedo, 214,5 g de peso seco, 0,41 mol) en tetrahidrofurano (1,01), se añade metilamina (2 M en tetrahidrofurano, 687 ml) durante 1 h. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, se añade más metilamina (2 M en tetrahidrofurano, 53 ml) y se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h. Se reduce la mezcla en volumen hasta 600 ml, a través de destilación al vacío, y se añade tetrahidrofurano (300 ml), antes de volver a reducir la mezcla en volumen hasta aproximadamente 750 ml. A la mezcla, calentada a 45 °C, se añade 2-propanol (247 ml) y agua (693 ml). Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se recoge el material sólido por filtración, se lava con agua (2 x 250 ml) y se seca al vacío a 65 °C, dando el compuesto del título (180,4 g).

15 RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,17-1,32 (2H), 1,57-1,73 (4H), 1,76-1,92 (1H), 1,93-2,08 (2H), 2,30-2,39 (3H), 2,53-2,62 (3H), 2,87-2,98 (2H), 3,07-3,17 (3H), 4,53-4,75 (1H), 6,81-6,94 (1H), 7,38-7,47 (2H), 7,56-7,65 (1H), 7,92-8,02 (2H), 8,15-8,27 (1H).

- 20 Procedimiento (b). A una solución del compuesto de la Preparación 2 (165 g, 0,34 mol) en THF (1,65 l) y *N,N*-dimetilformamida (5,0 ml) a 0-5 °C, se añade cloruro de tionilo (125 ml, 17 mol), durante 25 min. Se agitó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 0-5 °C y después se calentó lentamente hasta 40 °C durante 8 h. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se evaporó el disolvente a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con THF para eliminar el cloruro de tionilo. Al cloruro de sulfonilo obtenido, se añadió THF recién preparado (1,65 l) y se enfrió la mezcla hasta 0 °C. Se purgó el gas de *N*-metilamina seco durante 30 minutos y se agitó la reacción durante otras 4 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el disolvente hasta la mitad de su volumen (800 ml), y se añadió heptano (1,5 l). El producto precipitó, y se filtró y se lavó con agua (1 l), dando el compuesto del título (80 g).

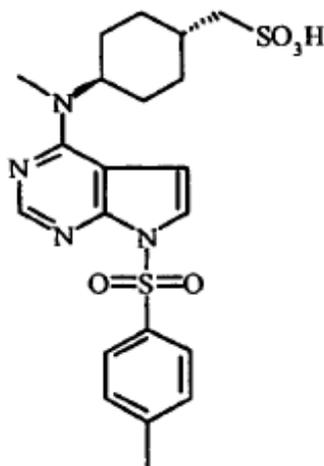
25 RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,17-1,32 (2H), 1,57-1,73 (4H), 1,76-1,92 (1H), 1,93-2,08 (2H), 2,30-2,39 (3H), 2,53-2,62 (3H), 2,87-2,98 (2H), 3,07-3,17 (3H), 4,53-4,75 (1H), 6,81-6,94 (1H), 7,38-7,47 (2H), 7,56-7,65 (1H), 7,92-8,02 (2H), 8,15-8,27 (1H).

Preparación 2: cloruro de [trans-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonyl]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil] metanosulfonilo



5 A una solución del compuesto de la Preparación 3 (210,0 g, 0,42 mol) en diclorometano (1,2 l) y *N,N*-
 dimetilformamida (4,1 ml), se añade cloruro de tionilo (151,0 ml, 2,1 mol) durante 25 min. Se calienta la mezcla de
 reacción a reflujo durante 18 h y después se reduce en volumen hasta 800 ml mediante destilación al vacío. A la
 mezcla, calentada a aproximadamente 30 °C, se añade acetato de etilo (1,1 l) durante 1 h, seguido de heptano
 (546 ml), durante 20 min a temperatura ambiente. Se enfría la mezcla hasta 0 °C y se agita durante 1 h, y se recoge
 el precipitado resultante por filtración en atmósfera de nitrógeno. Se lava el sólido con heptano (2 x 125 ml), dando el
 10 compuesto del título (308,0 g de peso húmedo), que se almacena en atmósfera de nitrógeno y se usa directamente.

Preparación 3: ácido [trans-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonyl]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil] metanosulfónico



15 Procedimiento (a). A una mezcla del compuesto de la Preparación 4 (100,0 g de peso húmedo, 23,5 g de peso seco,
 47,8 mmol) y ácido fórmico (82,0 g, 68,0 ml, 1,8 mol), se añade peróxido de hidrógeno (35 % en peso en agua,
 21,0 ml, 0,26 mol) durante 10 min. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 h y después
 se inactiva mediante la adición a una solución acuosa de metabisulfato o metabisulfito de sodio (33 % en peso,
 35 ml). Se añade agua a la mezcla (5 ml), 2-propanol (50 ml) y solución acuosa de hidróxido de sodio (33 % en
 peso, 161 ml), y se agita la suspensión a temperatura ambiente durante 1 h. Se recoge el material sólido por
 20 filtración, se lava con agua (100 ml) y se seca al vacío a 60 °C, dando el compuesto del título (26,0 g).

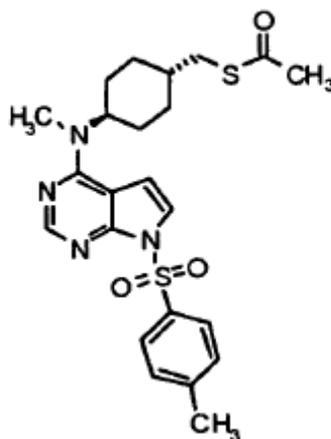
RMN de ¹H (d₆-DMSO): 0,98-1,18 (2H), 1,55-1,76 (5H), 1,99-2,13 (2H), 2,29-2,39 (5H), 3,05-3,15 (3H), 4,47-4,76
 (1H), 6,77-6,92 (1H), 7,38-7,48 (2H), 7,54-7,62 (1 H), 7,91-8,02 (2H), 8,17-8,25 (1H).

Procedimiento (b). A una solución del compuesto de la Preparación 3 en IPA-agua (585 ml de cada, 1:1, v/v), se
 añadió sulfato de sodio y la mezcla se calentó hasta 80-90 °C durante 24 horas. Tras dejar enfriar hasta la

temperatura ambiente, se evaporó el disolvente hasta el 50 % y se ajustó el pH de la mezcla de reacción en el intervalo 3-4 mediante la adición de ácido acético. Se añadió tolueno (1 l) y se evaporó la mezcla hasta un 80 %. Se añadió más tolueno (1 l), y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. Se decantó el tolueno y se obtuvo el compuesto del título resultante mediante secado al vacío (168 g).

- 5 RMN de ^1H (d_6 -DMSO): 0,98-1,18 (2H), 1,55-1,76 (5H), 1,99-2,13 (2H), 2,29-2,39 (5H), 3,05-3,15 (3H), 4,47-4,76 (1H), 6,77-6,92 (1H), 7,38-7,48 (2H), 7,54-7,62 (1H), 7,91-8,02 (2H), 8,17-8,25 (1H)

Preparación 4. *S*-{[*trans*-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil]metil} etanoato



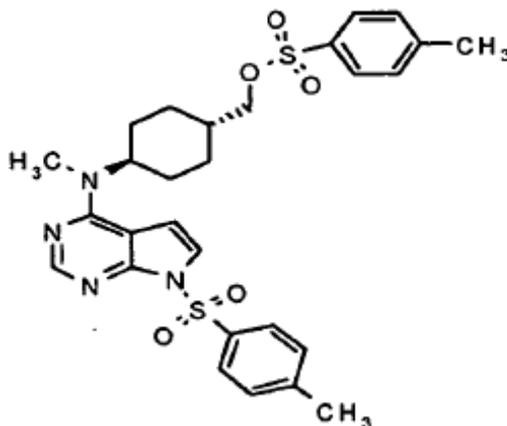
10

A una solución de tioacetato de potasio (11,4 g, 99,4 mmol) en sulfóxido de dimetilo (30 ml), se añade el compuesto de la Preparación 5 (50,0 g, 87,9 mmol) en sulfóxido de dimetilo (130 ml). Se calienta la mezcla de reacción a 55 °C durante 3 h, se enfría hasta la temperatura ambiente y se inactiva mediante la adición a una solución acuosa de bicarbonato de sodio (0,1 M, 640 ml). Se enfría la mezcla hasta 13 °C, y se recoge el precipitado resultante por filtración y se lava con agua (250 ml), dando el compuesto del título (204,0 g de peso húmedo).

15

RMN de ^1H (d_6 -DMSO): 1,06-1,23 (2H), 1,39-1,51 (1H), 1,51-1,70 (4H), 1,74-1,88 (2H), 2,30-2,40 (6H), 2,73-2,84 (2H), 3,06-3,14 (3H), 4,44-4,76 (1H), 6,76-6,94 (1H), 7,36-7,49 (2H), 7,56-7,62 (1H), 7,90-8,02 (2H), 8,17-8,26 (1H).

Preparación 5. [trans-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino)ciclohexil]metil-4-metilbencenosulfonato



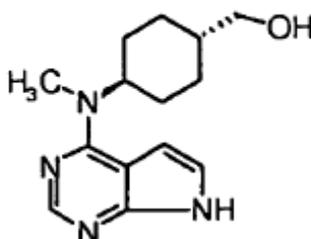
20

A una solución del compuesto de la Preparación 6 (42,0 g, 0,16 mol) en diclorometano (1 l), se añade trietilamina (68,3 g, 0,68 mol) y 4-dimetilaminopiridina (1,0 g, 8,2 mmol), seguidas de cloruro de *p*-toluenosulfonilo (62 g, 0,33 mol). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h, antes de la adición de más cloruro de

5 *p*-toluenosulfonilo (45,5 g, 0,24 mol). Después de agitar durante 18 h, se concentra la mezcla al vacío y se suspende una porción del residuo (aproximadamente 309 g) en metanol (758 ml) durante 15 min. Se añade agua a la suspensión (600 ml) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (142 ml), y se agita la mezcla durante 1 h. Se recoge el material sólido por filtración y se lava con metanol:agua [1:1, 50 ml], agua (50 ml) y hexanos (50 ml). Se seca el sólido al vacío a 60 °C, dando el compuesto del título (87,1 g).

RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,02-1,20 (2H), 1,53-1,75 (7H), 2,31-2,39 (3H), 2,39-2,47 (3H), 3,04-3,12 (3H), 3,80-3,91 (2H), 4,34-4,76 (1H), 6,78-6,93 (1H), 7,37-7,54 (4H), 7,54-7,64 (1H), 7,75-7,84 (2H), 7,91-8,01 (2H), 8,14-8,25 (1H).

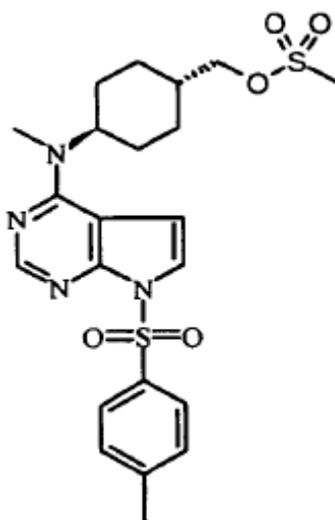
Preparación 6. {*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}-metanol



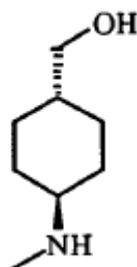
10 Se calienta a 90 °C durante 15 h una mezcla del compuesto de *trans*-4-(metilamino)ciclohexil]metanol (se puede preparar de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO 2002/14267) (50,0 g, 0,35 mol), 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (disponible en el mercado, 42,9 g, 0,27 mol) y carbonato de potasio (57,3 g, 0,42 mol) en agua (1 l) y 1,4-dioxano (100 ml). Se añade a la mezcla el compuesto de la Preparación 7 (2,0 g, 14,0 mmol), y se calienta la mezcla de reacción a 90 °C durante 1 h más. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se agita la mezcla durante 1 h y se recoge el material sólido por filtración, se lava con agua (150 ml) y se seca al vacío a 65 °C, dando el compuesto del título (72,7 g).

15 RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,00-1,19 (2H), 1,30-1,45 (1H), 1,52-1,77 (4H), 1,77-1,91 (2H), 3,09-3,20 (3H), 3,20-3,29 (2H), 4,37-4,51 (1H), 6,45-6,57 (1H), 7,06-7,17 (1H), 8,01-8,14 (1H).

Preparación 7. [*trans*-4-(metil{7-[(4-metilfenil)sulfonil]-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil]metanosulfonato

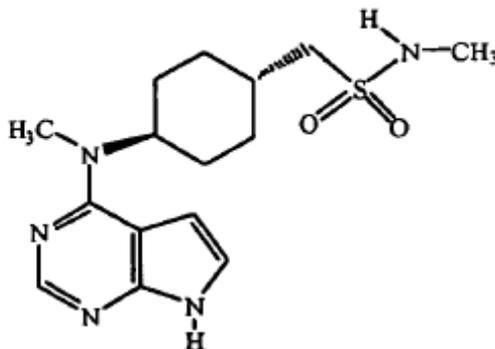


20 A una solución del compuesto de la Preparación 4 (60,0 g, 0,418 mol) en acetona (600 ml), se añade trietilamina (117,5 ml, 0,837 mol) y yoduro de potasio catalítico (3,4 g, 0,05 mol), seguidos de 4-cloro-7*H*-pirrolo [2,3-*d*]pirimidina (disponible en el mercado, 102,8 g, 0,335 mol). Se calentó la mezcla resultante hasta 60 °C durante 22 h. Tras dejar enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadió acetona (300 ml), seguida de trietilamina (146,9 ml, 1,04 mol) y luego de cloruro de mesilo (81,7 ml, 1,047 mol). Tras agitar durante 4 horas a temperatura ambiente, se añadió agua (1,8 l), tras lo que precipitó el producto. Se filtró el producto, se secó y se trituró con una mezcla de MTBE-heptano (6:4, 600 ml). Se llevó a cabo una segunda trituración en MTBE-heptano y se obtuvo el compuesto del título resultante (120 g). RMN de ¹H (d₆-DMSO):

Preparación 8: [*trans*-4-(metilamino)ciclohexil]metanol

- Se añadió solución de Vitride (65 %, 767 ml, 2,465 mol) gota a gota durante 1 h a una solución de ácido *trans*-4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]ciclohexanocarboxílico (disponible en el mercado, 100 g, 0,4109 mol) en tolueno (1 l).
 5 Una vez completada la adición, se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 100-110 °C. Se inactivó la mezcla de reacción con solución acuosa de sulfato de sodio (800 ml) a temperaturas inferiores a 10 °C. Se filtró la mezcla de reacción a través de celite y se lavó la torta del filtro con DCM (500 ml) seguido de agua (100 ml). Se separó la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa dos veces con DCM (600 ml y luego 400 ml). Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio y se concentraron al vacío, dando el compuesto del título (62 g).
- 10 RMN de ¹H (CD₃OD): 1,08-1,31 (4H), 1,51-1,64 (1H), 1,93-2,05 (2H), 2,10-2,22 (2H), 2,38-2,50 (1H), 2,50-2,54 (3H), 3,48-3,55 (2H).

Ejemplo 1a. Preparación de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil} metanosulfonamida.



- 15 A una solución del compuesto de la Preparación 1 (250,0 g, 0,48 mol) en 2-propanol (1,2 l), se añade hidróxido de litio (48,7 g, 2,03 mol) en agua (1,2 l). Se calienta la mezcla de reacción hasta 40 °C durante 8 h y después se agita a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtra la mezcla, lavando a través con 2-propanol:agua (1:1, 100 ml), y se ajusta el filtrado a pH 7,5 mediante la adición de ácido clorhídrico (6 N). Tras agitar durante 1 h, se recoge el material sólido por filtración, se lava con 2-propanol:agua (1: 2, 240 ml) y se seca al vacío a 60 °C, dando el compuesto del título (148,7 g) en forma de un base libre (Ejemplo 1a).
- 20

RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,20-1,39 (2H), 1,62-1,75 (4H), 1,77-1,91 (1H), 1,97-2,11 (2H), 2,54-2,63 (3H), 2,89-2,99 (2H), 3,10-3,21 (3H), 4,44-4,86 (1 H), 6,43-6,61 (1H), 7,01-7,19 (1H), 7,94-8,16 (1H).

Ejemplo 1b. Preparación de sal de ácido maleico de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida

- 25 Se agita una mezcla del compuesto del Ejemplo 1a (212,0 g, 628,3 mmol) y ácido maleico (67,2 g, 579,0 mmol) en 1-butanol (3.200 ml) y agua (400 ml) a temperatura ambiente durante 18 h. Se reduce la mezcla en volumen hasta 1.600 ml, mediante destilación al vacío (55 °C, 10 kPa) y, a continuación, se enfría hasta 0 °C. Se recoge el sólido resultante por filtración, se lava con heptano (500 ml) y se seca al vacío a 35 °C, dando la sal maleato de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]-ciclohexil}metanosulfonamida (253,0 g) como una forma cristalina conocida como la Forma A. MH⁺ experimental: 338,2; esperado: 338,2.
- 30

RMN de ¹H (d₆-DMSO): 1,24-1,38 (2H), 1,68-1,92 (5H), 2,00-2,11 (2H), 2,56-2,61 (3H), 2,91-3,00 (2H), 3,15-3,27 (3H), 4,39-4,70 (1H), 6,53-6,73 (1H), 7,16-7,36 (1H), 8,07-8,29 (1H).

Ejemplo 1c. Procedimiento para la recogida de difracción de rayos X en polvo de sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}-metanosulfonamida* (Forma A)

Los patrones de difracción de rayos X en polvo para la Forma A, sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}-metanosulfonamida*, se recogieron usando un difractómetro de rayos X en polvo D4 de Bruker-AXS Ltd. dotado de un cambiador automático de muestras, un goniómetro theta-theta, hendidura de divergencia del haz automática y un detector PSD Vantec-1. Se preparó la muestra para el análisis montándola en un soporte de muestras de oblea de silicio con cavidad de bajo fondo. Se hizo girar la muestra mientras se irradiaba con rayos X $K\text{-}\alpha_1$ del cobre (longitud de onda = 1,5406 Angstroms) con el tubo de rayos X funcionando a 40 kV/35 mA. Los análisis se realizaron con el goniómetro funcionando en el modo continuo fijado en un recuento de 0,2 segundos por etapa a 0,018 ° en un intervalo dos theta de 2 ° a 55 °. Los resultados se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1

Picos de difracción de rayos X en polvo expresados en grados 2-theta, $\pm 0,2$ grados aproximadamente					
Ángulo 2-theta	Intensidad (% de I)	Ángulo 2-theta	Intensidad (% de I)	Ángulo 2-theta	Intensidad (% de I)
6,178	72,6	17,997	32,3	24,86	19,8
8,519	24,5	18,539	44,5	25,602	10,7
12,601	88,4	20,298	18,2	26,582	13
13,819	38	20,659	27,8	27,02	30,6
15,478	34,3	21,583	11,1	27,721	18,7
15,719	100	22,642	12,7	28,161	23,7
16,32	27,1	23,08	12,1	28,38	28,9

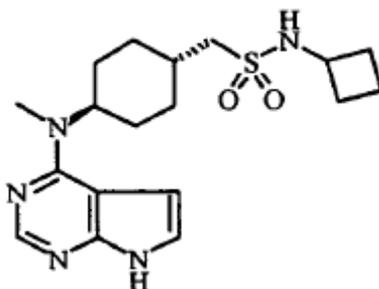
Tabla 2

Picos de difracción de rayos X en polvo seleccionados expresados en grados 2-theta, $\pm 0,2$ grados aproximadamente		
Ángulo 2-theta	Dimensión de la red cristalina (d(A))	Intensidad (% de I)
6,179	14,3	73
12,601	7,01	88
15,719	5,63	100
18,539	4,78	45
27,02	3,29	30,6
28,38	3,14	28,9

Como es evidente para cualquier experto en la materia, los resultados de cualquier difracción de rayos X en polvo pueden variar, y las DRXP posteriores no serán idénticas, incluso llevándose a cabo en el mismo lote de material. Esta variación se puede deber a la preparación de la muestra de ensayo, la temperatura, el modelo particular de difractómetro de rayos X usado, la técnica del operador, etc. El término "aproximadamente", si se usa en la definición de un pico de un patrón de difracción de rayos X en polvo, se define como el valor 2θ indicado $\pm 0,2$ ° 2θ . Cualquier determinación de si una forma cristalina es la Forma A polimorfa y está abarcada por las reivindicaciones se debe interpretar a la luz de la variabilidad de este ensayo.

Esta variabilidad se demuestra en la Figura 1. Los dos lotes diferentes de Forma A de sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*{trans-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}-metanosulfonamida* se sometieron al mismo difractómetro de DRXP. Los picos característicos de la Figura 1 confirman que se trata de la forma A polimorfa. Sin embargo, la intensidad relativa de estos picos, así como los otros picos de identificación variaron ligeramente.

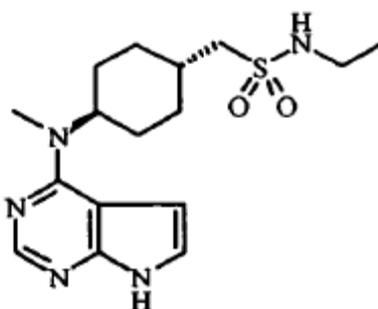
Ejemplo 2. Preparación de *N*-ciclobutil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida



5 Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 1 y haciendo variaciones sin importancia, pero sustituyendo el precursor de ciclobutanamina, se proporciona el compuesto del título. MH^+ experimental: 378,0; esperado: 378,2.

RMN de 1H (d_6 -DMSO): 1,22-1,32 (2H), 1,47-1,70 (6H), 1,78-2,04 (5H), 2,16-2,24 (2H), 2,85-2,86 (2H), 3,15 (3H), 3,68-3,78 (1H), 4,60-4,72 (1H), 6,51-6,54 (1H), 7,11-7,12 (1H), 7,44-7,49 (1H), 8,08 (1H), 11,60 (1H).

Ejemplo 3. Preparación de *N*-etil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida



10 Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 1 y haciendo variaciones sin importancia, pero sustituyendo el precursor de etanamina, se proporciona el compuesto del título.

MH^+ experimental: 352,0; esperado: 352,2.

RMN de 1H ($CDCl_3$): 1,24-1,44 (5H), 1,64-1,74 (2H), 1,87-2,09 (3H), 2,15-2,21 (2H), 2,97-2,99 (2H), 3,18-3,27 (5H), 4,46-4,52 (1H), 4,74-4,86 (1H), 6,55 (1H), 7,04 (1H), 8,28 (1H).

15 **Ejemplo 4.** Ensayo enzimático de JAK

20 **Materiales:** La JAK-2 recombinante (Número de catálogo PV4210) y JAK-3 (Número de catálogo PV3855) se adquirieron en (Invitrogen Corporation, Madison, WI). La JAK-1 recombinante (GST-JAK-1 (852-1142)) y Tyk-2 (GST-Tyk2 (870-1187, C1187S)) usadas en el presente estudio se expresaron y se purificaron en los laboratorios Pfizer. La adenosina 5'-trifosfato (ATP) se obtuvo de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. El péptido JAKtide (secuencia de péptido, FITC-KGGEEEEYFELVKK (SEC ID N^o: 1)) usado para los ensayos de JAK-2 y JAK-3 y el péptido IRS-1 (secuencia de péptido, 5-FAM-KKSRGDYMTMQIG (SEC ID N^o: 2)) usado para los ensayos de JAK-1 y Tyk-2 se adquirieron en (American Peptide Company, Sunnyvale, CA). El reactivo de recubrimiento 3 se adquirió en (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

25 **Procedimientos:** se usó un ensayo de cambio de movilidad de los péptidos para cuantificar la fosforilación del péptido JAKtide (JAK-2 y JAK-3) o del péptido IRS-1 (JAK-1 y Tyk-2). Las reacciones se llevaron a cabo en una placa de 384 pocillos (matricial MP-101) en un volumen total de 10 microlitros. Las mezclas de reacción contenían HEPES 20 mM, pH 7,4, cloruro de magnesio 10 mM, albúmina de suero bovino al 0,01 % (ASB), Tween-20 al 0,0005 %, ATP (4 micromolar para JAK-2 y JAK-3, 40 micromolar para JAK-1 y 7 micromolar para Tyk-2)), DMSO al 2 % y sustrato peptídico 1 micromolar (péptido JAKtide para JAK-2 y JAK-3 o IRS-1 para JAK-1 y Tyk-2). Los compuestos se diluyeron en serie en dimetilsulfóxido al 100 % y se ensayaron en una respuesta a la dosis de 11 puntos por duplicado o cuadruplicado (se añadieron 200 nl de compuesto/DMSO por reacción de 10 microlitros). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de enzima a la concentración final de 2 nM de JAK-2, 1 nM de JAK-3, 7 nM de Tyk2 o 20 nM de JAK-1. El ensayo se realizó durante 240 minutos para JAK-1, 150 minutos para JAK-2, 90 minutos para JAK-3 y 60 minutos para Tyk-2. Los ensayos se detuvieron en los tiempos especificados con 20

microlitros de HEPES 140 mM, EDTA 22,5 mM y reactivo de recubrimiento 3 al 0,15 %. Las placas se colocaron en un instrumento LabChip 3000 (LC3000) (Caliper Life Sciences) para medir la formación de péptido fosforilado. Los datos se analizaron usando el programa informático Hits Well Analyzer de (Caliper Life Sciences), obteniéndose la cantidad de producto formado.

- 5 A continuación, se importaron los datos en una aplicación interna, donde se expresó cada punto de datos como el % de inhibición basado en los controles no inhibidos y no enzimáticos. Seguidamente, se ajustaron los datos de dosis-respuesta usando una ecuación logística de 4 parámetros (Ecuación 1) para determinar un valor de CI_{50} .

$$y = \frac{\text{máx} - \text{mín}}{1 + \left(\frac{x}{CI_{50}}\right)^s} + \text{mín}$$

Ecuación 1:

- 10 Donde máx es el valor no inhibido ajustado, mín es el valor de inhibición completa ajustado y s es el factor de pendiente.

Usando este protocolo, se generaron los siguientes resultados para los compuestos del título del Ejemplo 1 y 2.

Tabla 3

Resultados del ensayo enzimático de JAK				
Ej. Nº	CI_{50} de JAK-1	CI_{50} de JAK-2	CI_{50} de JAK-3	CI_{50} de Tyk-2
1a	9,53 nM	17,5 nM	95,1 nM	75,1 nM
2	45,0 nM	101,0 nM	742 nM	-

Ejemplo 5. Ensayo canino *in vitro* de proliferación de linfocitos T

- 15 La activación de los linfocitos T desempeña un papel clave en una variedad de trastornos inflamatorios y autoinmunes, así como en el asma, las alergias y el prurito. Puesto que la activación de los linfocitos T, en parte, puede ser desencadenada por citocinas que señalan a través de la vía JAK-STAT, un inhibidor de JAK podría ser eficaz contra dichas enfermedades que implican la activación aberrante de los linfocitos T.

- 20 Procedimientos: se recogió sangre canina completa en tubos de heparina de sodio de 29 perros Beagle y 23 perros de raza mestiza. Se sembró la sangre entera (20 μ l) en placas de 96 pocillos (Costar 3598) con 180 μ l de medio (RPMI 1640, Gibco Nº 21870-076, con suero bovino fetal inactivado por calor al 1 %, Gibco Nº 10082-39, 292 μ g/ml de L-glutamina, Gibco Nº 250030-081, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g de estreptomina por ml, Gibco Nº 15140-122) que contenía el control de vehículo o compuesto de ensayo (0,001 a 10 μ M), concanavalina A (ConA; 1 μ g/ml, Sigma C5275) e interleucina-2 canina (IL-2; 50 ng/ml, R & D Systems 1815-CL/CF). Los pocillos que contenían la sangre entera, medio con control de vehículo y sin ConA o IL-2 se usaron como controles de fondo. Se incubaron las placas a 37 °C durante 48 horas. Se añadió timidina valorada, 0,4 μ Ci/pocillo (Perkin Elmer, Net027A-005MC) durante 20 horas más. Se congelaron las placas, y luego se descongelaron, se lavaron y se filtraron usando un cosechador de células MLR-96 de Brandel y esteras filtrantes prehumedecidas (Wallac 1205-401, Perkin Elmer). Se secaron los filtros a 60 °C durante una hora (horno de convección 16EG de Precision) y se colocaron en bolsas de muestras del filtro (Wallac 1205-411, Perkin Elmer) con 10 ml de líquido de centelleo (Wallac 1205-440, Perkin Elmer). Se realizó el recuento en los filtros sellados en un contador de centelleo líquido Betaplate LKB Wallac 1205. Se recogieron los datos mediante el programa Gterm Betaplate v 1.1 (derechos de autor de Wallac, 1989-1990) y se transformaron en porcentajes de inhibición, calculados usando la siguiente fórmula:

$$100 - \left[\frac{(\text{media de cpm del tratamiento con fármaco} - \text{media de cpm de BCK})}{(\text{media de cpm del tratamiento sin fármaco} - \text{media de cpm de BCK})} \times 100 \right] = \% \text{ de inhibición}$$

- 35 Los datos se representaron gráficamente como el porcentaje de inhibición usando GraphPad Prism 4.0, y las curvas de CI_{50} se ajustaron usando un análisis de punto a punto.

Resultados: los valores de CI_{50} media obtenidos cuando se usó sangre entera de perros Beagle fueron de 66,3 nM para el compuesto del Ejemplo 1a; 410 nM para el Ejemplo 2; y 83 nM para el Ejemplo 3. El valor de CI_{50} media obtenido cuando se usó sangre entera de perros de raza mestiza fue de 138 nM para el compuesto del Ejemplo 1a.

Estos datos sugieren que los compuestos de la presente invención son eficaces en la inhibición de la proliferación de los linfocitos T, una característica clave en muchas enfermedades.

Ejemplo 6. Ensayo de reducción del prurito y de la dermatitis asociados a las pulgas

5 El prurito y la dermatitis asociados a las pulgas son afecciones cutáneas comunes en los perros. El prurito es uno de los signos clínicos más graves asociados con la dermatitis asociada a pulgas, y el rascado continuado, el frotamiento de la cara y el mordisqueo de las pezuñas pueden conducir a una variedad de cambios en la piel tales como eritema, edema, alopecia, liquenificación e hiperpigmentación. El prurito y la dermatitis asociados a las pulgas se pueden inducir experimentalmente. En estos modelos, se ha observado que las células inflamatorias y las citocinas median en reacciones inmunes a los alérgenos. Por lo tanto, un inhibidor de JAK que inhiba la transducción de
10 señales de los receptores de citocinas pruritogénicas y proinflamatorias podría ser eficaz en la inhibición, reducción o minimización del prurito y de la dermatitis asociados a las pulgas.

Diseño del estudio

15 Se infestaron veintiocho perros machos y hembras de razas mestizas con un peso variable de 5 a 35 kg y de más de un año de vida con aproximadamente 100 pulgas de gato adultas sin alimentar (*Ctenocephalides felis*) 14 días antes del inicio de la dosificación, y se volvieron a infestar con 30 pulgas por perro cada 4 días durante el estudio. Siete días antes de la dosificación, se distribuyeron aleatoriamente veinticuatro perros en tres grupos diferentes de tratamiento, placebo, 0,5 mg/kg o 0,25 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1b, en base a las puntuaciones de una escala analógica visual (EAV) de lesiones cutáneas. Los tratamientos se administraron por vía oral dos veces al día durante 28 días, y se evaluó el comportamiento pruriginoso, así como el eritema y las lesiones cutáneas durante el estudio. Se registró el comportamiento pruriginoso colocando a los perros en corrales con capacidad de grabación por vídeo, y grabando su actividad durante 4 horas. Se cuantificó la actividad pruriginosa determinando cuántos segundos pasaron los perros rascándose. Se registraron las lesiones cutáneas mediante la captura de imágenes de la región inguinal abdominal, y se clasificó la gravedad de acuerdo con una escala analógica visual (EAV).
20

Análisis estadístico:

25 El tiempo transcurrido de comportamiento pruriginoso capturado por vídeo se analizó mediante un modelo lineal mixto para medidas repetidas. El modelo incluyó los efectos fijos del tratamiento y el día del estudio, y la interacción del tratamiento y el día del estudio. Los efectos aleatorios incluían el bloque, la interacción entre el bloque y el tratamiento, y el error. Los datos de referencia para el comportamiento pruriginoso (día -1) se usaron como covariable en el análisis del comportamiento pruriginoso. Las medias por mínimos cuadrados se usaron como estimaciones de las medias del tratamiento. Se estimaron los errores estándar de las medias por mínimos cuadrados y se construyeron intervalos de confianza del 90 %. Se calcularon las medias geométricas a partir de las medias por mínimos cuadrados para los datos transformados logarítmicamente. Se usaron contrastes a priori para evaluar el tratamiento. Las diferencias del tratamiento se evaluaron al nivel de significación del 10 % ($P \leq 0,10$).
30

Resultados

35 Los resultados del tratamiento se muestran en la Figura 2 y la Figura 3. Las lesiones y el eritema se redujeron significativamente en el grupo de 0,5 mg/kg. La Figura 2 ilustra las puntuaciones de la EAV del día 27 para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a las pulgas (medias por mínimos cuadrados). Se observaron reducciones significativas en el prurito en comparación con el placebo a un nivel de significación del 10 % en varios puntos temporales durante el estudio para ambos grupos (días 1, 4 y 12 para la dosis de 0,25 mg/kg y días 1 y 20 para la dosis de 0,5 mg/kg). La Figura 3 ilustra los segundos de prurito durante la grabación de 4 horas para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a las pulgas (Media geométrica larga).
40

Ejemplo 7. Ensayo de inhibidor de la proliferación celular

45 Líneas celulares felinas. La MYA-1 y FETJ son líneas celulares felinas de linfoblastos T obtenidas a partir de ATCC (Manassas, VA). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 completo suplementado con SFB al 10 % a 37 °C en un incubador humidificado con CO₂ al 5 %.

Tejido ganglionar de linfoma canino ex vivo

50 Los ganglios linfáticos malignos fueron extirpados por el personal veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Estado de Michigan (MSU), y se colocaron en medios de transporte (medio completo Advanced RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10 % (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina y 0,25 ug/ml de anfotericina B (Invitrogen/Gibco®)). Los ganglios se procesaron en el plazo de 24 horas de la extracción, picándolos en trozos pequeños y haciéndolos pasar a través de un tamiz de tejido. Se centrifugaron las suspensiones celulares a 200 xg, se eliminó el sobrenadante y se volvió a suspender el sedimento celular en NH₄Cl durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se sedimentó la suspensión celular por centrifugación; se retiró el NH₄Cl y se lavó una vez con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), seguida de la resuspensión en medio de proliferación (medio RPMI completo de Advanced, SFB al 1 %, 2-mercaptoetanol 50 nM, 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina y 0,25 ug/ml de anfotericina B). A continuación, se hizo pasar la suspensión celular a
55

5 través de un cedazo para células de nylon de 100 μm (BD-Falcon) y se realizó el recuento usando un hemocitómetro. Las células se cultivaron bien en medio de proliferación solo, medio de proliferación suplementado con Pansorbin® al 0,005 % (células de *Staphylococcus aureus* (CSA) fijadas en formol inactivadas por calor, Calbiochem) y 10 ng/ml de IL-2 canina (R & D Systems), o medio de proliferación suplementado con 125 ng/ml de concavalina A (Sigma) y 125 ng/ml de lipopolisacárido (LPS; Calbiochem).

Procedimiento de ensayo contra la proliferación *in vitro*

10 Se sembraron las células cultivadas en el medio descrito anteriormente en placas Costar de 96 pocillos (Coming) a una densidad de 1×10^3 células/pocillo (líneas celulares felinas) o 2×10^5 células/pocillo (células de ganglios linfáticos) y se expusieron a diversas concentraciones de compuestos de ensayo durante hasta 5 días a 37 °C en un incubador humidificado con CO₂ al 5 %. Se determinaron los efectos sobre la proliferación usando el ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96® AQueous (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En general, la proliferación se midió indirectamente usando una sal soluble de tetrazolio (MTS) y un agente de acoplamiento de electrones. Se monitorizó la biorreducción de MTS en un producto de formazán soluble en medio de cultivo tisular mediante la absorbancia a 490 nM en un lector de placas Spectramax usando el programa informático Pro 4.6 Softmax (Molecular Devices). Los datos se representaron gráficamente como el porcentaje de control de DMSO usando GraphPad Prism 4.00, y las curvas de CI₅₀ se ajustaron usando un modelo de regresión no lineal con una respuesta a la dosis sigmoidea.

Resultados

20 La Tabla 4 demuestra que el compuesto del Ejemplo 1 puede inhibir la proliferación de la línea celular linfoide felina MYA-1 que depende de IL-2 para la proliferación, pero no una línea independiente de IL-2 (FETJ). El compuesto de fórmula IA o su sal también puede inhibir la proliferación de tejido ganglionar canino obtenido de perros diagnosticados con linfoma de linfocitos T o B. Estos resultados sugieren que un inhibidor de JAK puede ser eficaz en el tratamiento de linfomas caninos y felinos.

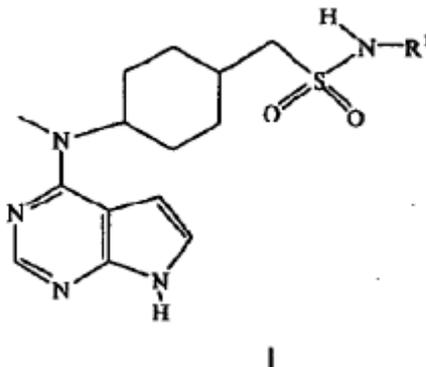
Tabla 4

Especie	Línea celular o ganglio linfático	Descripción	Estimulante en medio de cultivo	CI ₅₀ (nM)
Felina	MYA-1	Línea linfoide		122 (n = 2)
Felina	FETj	Línea linfoide		>1000
Canina	MSU LN 8	Linfoma de linfocitos T de novo	LPS + ConA	357
Canina	MSU LN 8	Linfoma de linfocitos T de novo	SAC + IL-2	38
Canina	MSU LN 9	Linfoma de linfocitos B de novo	LPS + ConA	147
Canina	MSU LN 9	Linfoma de linfocitos B de novo	SAC + IL-2	100
Canina	MSU LN 10	Linfoma de linfocitos B resistente a quimioterapia	LPS + ConA	687
Canina	MSU LN 11	Linfoma de linfocitos B de novo	LPS + ConA	64

25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R¹ es hidrocarburo (C₁₋₄) monovalente saturado lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con hidroxilo.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹ es metilo.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 10 4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, que es la Forma cristalina A de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida.
5. La Forma cristalina A de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene al menos un pico característico expresado en grados 2-theta a aproximadamente 6,2, 12,6 y 15,7.
- 15 6. La Forma cristalina A de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta a aproximadamente 6,2, 12,6, 15,7, 18,5 y 28,38.
- 20 7. La Forma cristalina A de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-{*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende un patrón de difracción de rayos X en polvo que tiene picos característicos expresados en grados 2-theta a aproximadamente 6,178, 8,519, 12,601, 13,819, 15,478, 15,719, 16,32, 17,997, 18,539, 20,298, 20,659, 21,583, 22,642, 23,08, 24,86, 25,602, 26,582, 27,02, 27,721, 28,161, 28,38.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Una combinación farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más agentes adicionales que modulan el sistema inmune o agentes antiinflamatorios de un mamífero.
- 30 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en terapia.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de reacciones alérgicas, dermatitis alérgica, dermatitis atópica, eczema o prurito en un mamífero.
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de cánceres, leucemia, lupus, mieloma múltiple en un mamífero.
- 35 13. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en las que el mamífero comprende animales de compañía.
14. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los animales de compañía son perros.

15. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en las que el mamífero comprende ganado.

5 16. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, cuyo compuesto es la Forma A de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida que comprende hacer reaccionar *N*-metil-1-*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil}metanosulfonamida con ácido maleico.

FIGURA 1
Patrón de difracción de rayos X en polvo de la sal de ácido maleico de *N*-metil-1-*trans*-4-[metil(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)amino]ciclohexil]metanosulfonamida (Forma A)

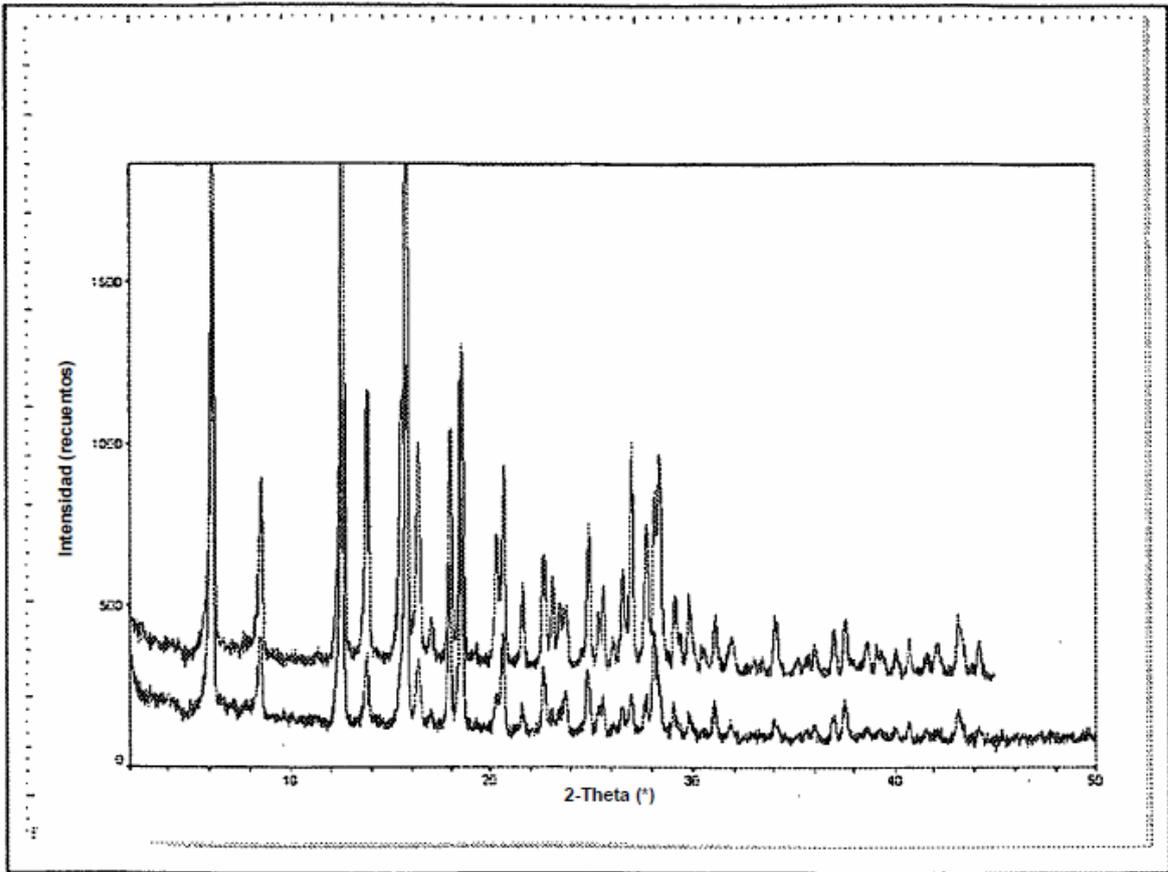


FIGURA 2
Puntuaciones de la EAV para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a las pulgas

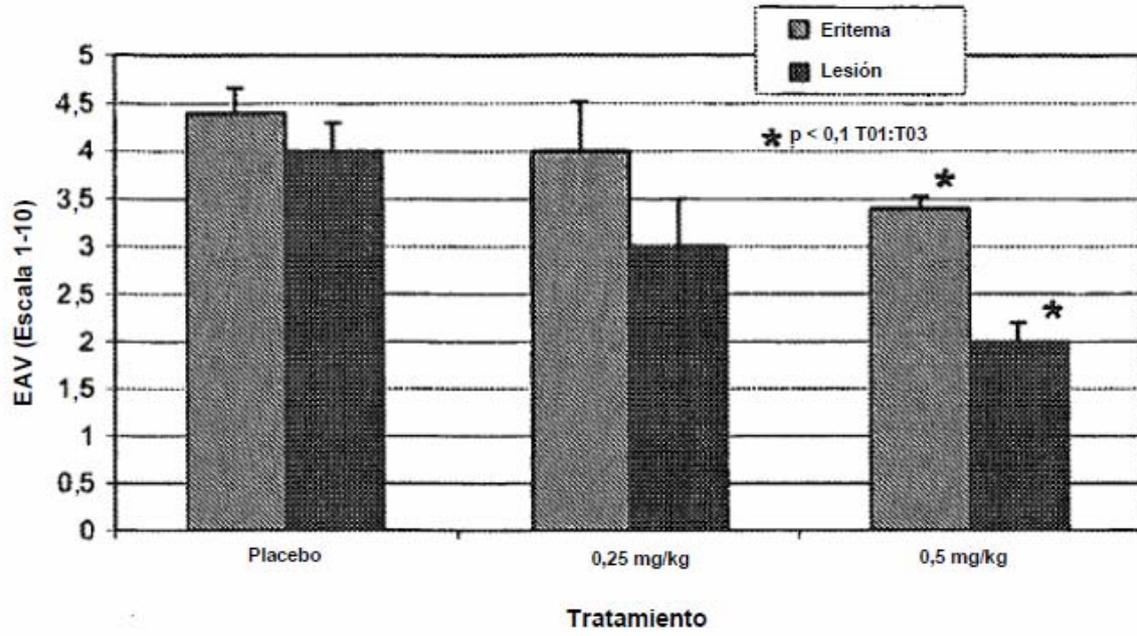


FIGURA 3
Segundos de prurito por registro de 4 horas para el Ejemplo 1b en perros alérgicos a las pulgas

