

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 133**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**C07D 491/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12770334 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2753621**

54 Título: **Procedimientos e intermediarios para fabricar un inhibidor de JAK**

30 Prioridad:

**07.09.2011 US 201161531896 P**

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

**18.03.2016**

73 Titular/es:

**INCYTE HOLDINGS CORPORATION (100.0%)  
1801 Augustine Cut-Off  
Wilmington, DE 19803, US**

72 Inventor/es:

**ZHOU, JIACHENG;  
LIU, PINGLI;  
CAO, GANFENG y  
WU, YONGZHONG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 564 133 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).

**Procedimientos e intermediarios para fabricar un inhibidor de JAK****Descripción****5 ÁREA TÉCNICA**

Este invento está relacionado a los procesos intermedios para hacer {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]acetidin-3-il}acetonitrilo, útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de las quinasas de Jano (JAK - Janus kinases) incluyendo trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, cáncer y otras enfermedades.

**ANTECEDENTES**

Las quinasas proteínicas (PKs - Protein kinases) regulan procesos biológicos diversos incluyendo el crecimiento celular, la supervivencia celular, la diferenciación celular, la formación de órganos, la morfogénesis, la revascularización, la reparación de tejidos y la regeneración, entre otros. Las quinasas proteínicas también juegan roles especializados en el hospedaje de enfermedades humanas incluyendo al cáncer. La citoquinas, polipéptidos o glicoproteínas de baja masa molecular, regulan a muchos senderos involucrados en la respuesta inflamatoria del hospedaje hacia la sepsis. Las citoquinas influyen la diferenciación, proliferación y activación celular, y pueden regular respuestas pro-inflamatorias y antiinflamatorias para permitir al anfitrión reaccionar apropiadamente a patógenos. La señalización de una amplia gama de citoquinas incluyen a la familia de quinasas de Jano (JAKs - Janus kinase) de quinasas proteínicas de tirosina y los Transductores y Activadores de Señales de Transcripción (STATs - Signal Transducers and Activators of Transcription). Existen 4 JAKs mamíferas conocidas: JAK1 (quinasa de Jano - 1), JAK2, JAK3 (también conocida como quinasa de Jano, leucocito; JAKL; y L-JAK) y TYK2 (quinasa proteínica de tirosina 2).

Las respuestas inmunológicas inflamatorias estimuladas por la citoquinas contribuyen a la patogénesis de las enfermedades: patologías tales como inmunodeficiencia combinada severa (SCID - severe combined immunodeficiency) surgen de la supresión del sistema inmunológico, mientras que una respuesta inmunológica/inflamatoria hiperactiva o inapropiada contribuyen a la patología de enfermedades autoinmunes (por ejemplo, asma, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis, miocarditis), y enfermedades tales como la escleroderma y osteoartritis (Ortmann, R. A., T. Cheng, et al. (2000) Arthritis (Artritis) Res 2(1): 16-32).

Las deficiencias en las expresiones de JAKs son asociadas con muchos estados de enfermedad. Por ejemplo, los ratones Jak1-/- son prematuros de nacimiento, no pueden ser amamantados, y mueren perinatalmente (Rodig, S. J., M. A. Meraz, et al. (1998) Cell (Célula) 93(3): 373-83). Los embriones de los ratones Jak2-/- son anémicos y mueren alrededor del día 12.5 post coito debido a la ausencia de eritropoyesis definitiva.

Se cree que el sendero JAK/STAT, y en particular los 4 JAKs, juegan un rol en la patogénesis de la respuesta asmática, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, de la bronquitis, y de otras enfermedades inflamatorias relacionadas a la tráquea respiratoria inferior. Varias citoquinas que emiten señales a través de JAKs han sido vinculadas a enfermedades/condiciones inflamatorias de la tráquea respiratoria superior, tales como aquellas que afectan a la nariz y a los senos nasales (por ejemplo, la rinitis y la sinusitis) ya sean reacciones alérgicas clásicamente o no. El sendero JAK/STAT también ha sido relacionado con enfermedades/condiciones inflamatorias del ojo y de respuestas alérgicas crónicas.

La activación de JAK/STAT en cánceres podría ocurrir por la estimulación de las citoquinas (por ejemplo, IL-6 o GM-CSF), o por una reducción en el supresor endógeno de las señales de JAK tal como SOCS (señalización de los supresores o de la citoquinas) o PIAS (inhibidor proteínico del STAT activado - protein inhibitor of activated STAT) (Boudny, V., y Kovarik, J., Neoplasia. 49:349-355, 2002). La activación de la señalización de STATs, así como otros senderos corriente abajo de JAKs (por ejemplo, Akt), han sido correlacionados con una mala prognosis en muchos tipos de cáncer (Bowman, T., et al. Oncogene 19:2474-2488, 2000). Niveles elevados de citoquinas circulantes por medio de JAK/STAT juegan un rol causal en la caquexia y fatiga crónica. Como tal, una inhibición de JAKs podría ser beneficiosa para pacientes del cáncer por razones que se extienden más allá de la actividad potencial anti-tumoral.

Las quinasas de tirosina JAK2 pueden ser beneficiosas para pacientes con trastornos mieloproliferativos, por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET - essential thrombocythemia), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM) (Levin, et al., Cancer Cell (Célula Cancerígena), vol. 7, 2005: 387-397). La inhibición de la quinasa JAK2V617F reduce la proliferación de células hematopoyéticas, sugiriendo a JAK2 como un objetivo potencial para la inhibición farmacológica en pacientes con PV, ET, y MMM.

La inhibición de JAKs podría beneficiar a pacientes que padecen de trastornos inmunológicos de la piel tal como psoriasis, y sensibilidad de la piel. El mantenimiento de la psoriasis, se cree que depende de varias citoquinas inflamatorias adicionalmente a varias citoquinas y factores de crecimiento (JCI, 113:1664-1675), muchos de los cuales señalizan a través de JAKs (Adv Pharmacol. 2000;47:113-74).

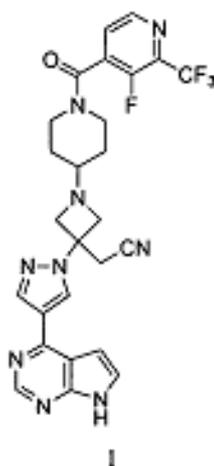
JAK1 juega un rol central en un número de senderos de señalización de factores de crecimiento y citoquinas que, cuando están desregulados, puede resultar en, o contribuir a, estados de enfermedad. Por ejemplo, los niveles de IL-6 son elevados en la artritis reumatoide, una enfermedad para la cual se ha sugerido que tiene unos efectos perjudiciales (Fonesca, J.E. et al., *Autoimmunity Reviews (Revisiones Autoinmunológicas)*, 8:538-42, 2009). Puesto que IL-6 señala, por lo menos en parte, a través de JAK1, se espera que el antagonizar a IL-6 directamente o indirectamente por medio de la inhibición de JAK1 suministrara beneficios clínicos (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J. S., et al. *Lancet* 371:987, 2008). Además, en algunos cánceres, JAK1 es mutado lo cual resulta en un crecimiento y supervivencia constitutivos no deseables de las células tumorales (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 106:9414-8, 2009; Flex E., et al. *J Exp Med.* 205:751-8, 2008). En otras enfermedades autoinmunes y cánceres niveles sistémicos elevados de citoquinas inflamatorias que activan a JAK1 también podrían contribuir a la enfermedad y/o a síntomas relacionados. Por lo tanto, pacientes con aquellas enfermedades podrían beneficiarse de la inhibición de JAK1. Inhibidores selectivos de JAK1 podrían ser eficaces puesto que estos podrían evitar efectos innecesarios y potencialmente no deseables debido a la inhibición de otras quinasas de JAK.

Los inhibidores selectivos de JAK1, en relación a otras quinasas JAK, podrían tener varias ventajas terapéuticas sobre inhibidores menos selectivos. En referencia a la selectividad en contra de JAK2, varias citoquinas importantes y factores de crecimiento señalan a través de JAK2 incluyendo, por ejemplo, a la eritropoyetina (Epo) y a la trombopoyetina (Tpo) (Parganas E, et al. *Cell.* 93:385-95, 1998). Epo es un factor de crecimiento clave para la producción de glóbulos rojos; por lo tanto una falta de señales que dependen de Epo podría resultar en números reducidos de glóbulos rojos y en anemia (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Tpo, otro ejemplo de un factor de crecimiento que depende de JAK2, juega un rol central en controlar la proliferación y maduración de megacariocitos-las células de las cuales se producen las plaquetas (Kaushansky K, *NEJM* 354:2034-45, 2006). Por lo tanto, una señalización reducida de Tpo reduciría los números de los megacariocitos (megacariocitopenia) y cuentas más bajas de plaquetas circulantes (trombocitopenia). Esto puede resultar en un sangrado no deseable y/o incontrolable. La inhibición reducida de otras JAKs, tales como JAK3 y Tyk2, también podría ser deseable puesto que los humanos que no tienen la versión funcional de estas quinasas han demostrado padecer de muchas enfermedades tales como inmunodeficiencia combinada severa o el síndrome de hiperinmunoglobulina E (Minegishi, Y, et al. *Immunity (Inmunidad)* 25:745-55, 2006; Macchi P, et al. *Nature (Naturaleza)*. 377:65-8, 1995). Por lo tanto, un inhibidor de JAK1 con una afinidad reducida a otras JAKs tendría ventajas significativas sobre un inhibidor menos selectivo con respecto a efectos colaterales reducidos que involucran la supresión inmunológica, la anemia y la trombocitopenia.

Debido a la utilidad de los inhibidores de JAK, existe una necesidad para el desarrollo de nuevos procesos para elaborar a inhibidores de JAK. Este invento es dirigido hacia esta y otras necesidades.

## RESUMEN

Los inhibidores de JAKs son descritos en la serie de Estados Unidos número 13/043,986, presentada el 9 de marzo de 2011, la cual está incorporada completamente en este documento por referencia, incluyendo a {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinilo]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]acetidin-3-il]acetonitrilo, el cual se muestra a continuación como la Fórmula I.

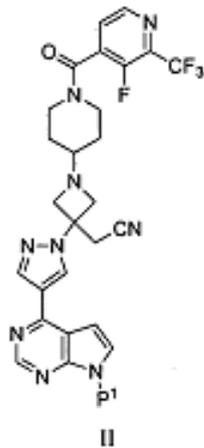


Este invento suministra, entre otros, a procesos e intermediarios para realizar el compuesto de la Fórmula I. En particular, este invento suministra procesos para elaborar al compuesto de la Fórmula II:

5

10

15



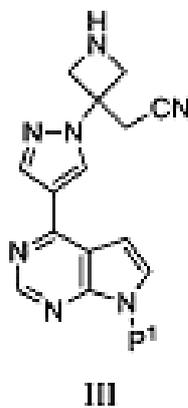
20

o una de sus sales, que comprende la reacción de un compuesto de la Fórmula III:

25

30

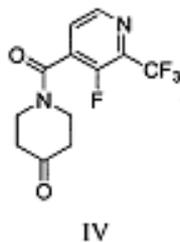
35



40

o una de sus sales, con un compuesto de la Fórmula IV:

45



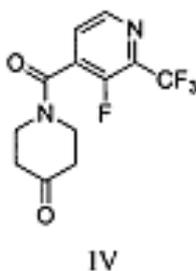
50

o una de sus sales, en la presencia de un agente reductor para formar al compuesto de la Fórmula II o una de sus sales ya mencionadas, siempre y cuando dicho agente reductor no sea cianoborodeuteruro de sodio; donde P<sup>1</sup> es un grupo protector.

55

Este invento también suministra procesos para elaborar un compuesto de la Fórmula IV:

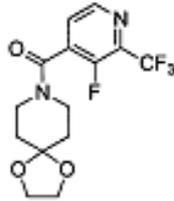
60



65

o una de sus sales, que comprende la desprotección de un compuesto de la Fórmula V:

5



10

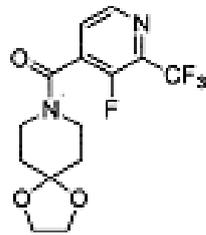
V

o una de sus sales, para formar un compuesto de la Fórmula IV, o una de sus sales ya mencionadas.

15

**[0015]** Este invento procesa la elaboración de un compuesto de la Fórmula V:

20

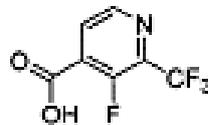


25

V

o una de sus sales, que comprende el reaccionar a un compuesto de la Fórmula VI:

30



35

VI

o una de sus sales, con un compuesto de la Fórmula VII:

40



45

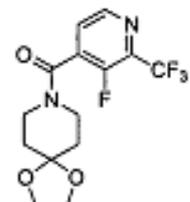
VII

En la presencia de un agente de acoplamiento para formar al compuesto de la Fórmula V, o a una de sus sales ya mencionadas.

55

Este invento suministra además el compuesto de la Fórmula V:

60



65

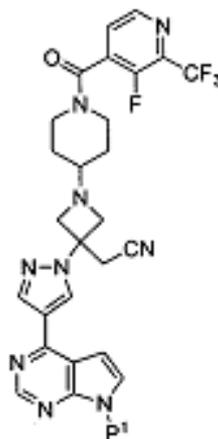
V

o una de sus sales.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Este invento suministra un proceso para elaborar un compuesto de la Fórmula II:

10



15

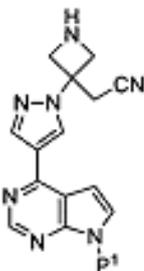
20

25

II

o una de sus sales, que comprende reaccionar a un compuesto de la Fórmula III:

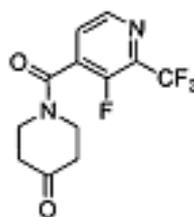
30



35

o una de sus sales, con un compuesto de la Fórmula IV:

40



45

50

IV

55

o una de sus sales, en la presencia de un agente reductor para formar al compuesto de la Fórmula II, o su sal ya mencionada, siempre y cuando dicho agente reductor no sea cianoborodeuteruro de sodio; donde P<sup>1</sup> es un grupo protector.

60

En algunas secciones, los compuestos de la Fórmula III y IV son usados preferiblemente como bases libres y el compuesto de la Fórmula II es producido preferiblemente como una base libre. Tal como se utiliza en este documento, la "base libre" significa una forma que no es sal del compuesto.

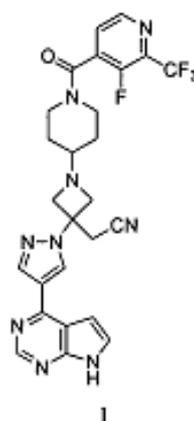
65

En algunas secciones, la reacción del compuesto III y del compuesto IV es ejecutada en la presencia de una amina terciaria (por ejemplo, trietilamina). En algunas secciones, la temperatura de la reacción es menor o igual que 30 °C. En algunas secciones, la reacción es ejecutada en un solvente adecuado. En algunas secciones, el solvente adecuado es diclorometano.

Los grupos protectores P<sup>1</sup> apropiados incluyen, pero no se limitan a, los grupos protectores para aminas delineados en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), 4<sup>ta</sup> ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey, páginas 696-887 (y, en particular, las páginas 872-887) (2007), la cual es incorporada completamente en este documento por referencia. En algunas secciones, el P<sup>1</sup> es benciloxycarbonilo (Cbz), 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxycarbonilo (Teoc), 2-(4-trifluorometilfenilsulfonil)etoxycarbonilo (Tsc), t-butoxycarbonilo (BOC), 1-adamantiloxycarbonilo (Adoc), 2-adamantilcarbonilo (2-Adoc), 2,4-dimetilpent-3-iloxy-carbonilo (Doc), ciclohexiloxycarbonilo (Hoc), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetoxycarbonilo (TcBOC), vinilo, 2-cloroetilo, 2-fenilsulfonietilo, alilo, bencilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, difenil-4-piridilmetilo, N',N'-dimetilhidrazinilo, metoximetilo, t-butoximetilo (Bum), benciloximetilo (BOM), 2-tetrahidropiranilo (THP), tri(alquilo C1-4)silil (por ejemplo, tri(isopropil)silil), 1,1-dietoximetilo, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (SEM) o N-pivaloiloximetilo (POM). En algunas secciones, P<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.

El agente reductor puede ser cualquier agente reductor adecuado para su uso en una aminación reductiva incluyendo a varios borohidruros y agentes reductores de boranos, tales como aquellos en Ellen W. Baxter y Allen B. Reitz, Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents (Aminaciones Reductoras de Compuestos Carbonilos con Agentes Reductores de Borohidruros y Boranos), Organic Reactions (Reacciones Orgánicas), capítulo 1, páginas 1-57 (Wiley, 2002), la cual está incorporada completamente en este documento en forma de referencia. Clases no limitantes de agentes reductores apropiados incluyen a borohidruros, cianoborohidruros, tri(acilo C1-4)oxiborohidruros (por ejemplo, derivados de triacetoxiborohidruro), hidruro de 9-borobiciclo[3.3.1]nonano, borohidruro de tri(alquilo C1-4), y derivados de disopinocampiteilcianoborohidruro, boranos de amino, complejos de borano-piridina, y boranos de alquilamina. Ejemplos no limitantes de agentes reductores apropiados incluyen a cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, hidruro de ciano-9-borobiciclo[3.3.1]nonano de sodio, cianoborohidruro de tetrabutilamonio, cianoborohidruro en un soporte sólido, triacetoxiborohidruro de tetrametilamonio, triacetoxiborohidruro de sodio, trietilborohidruro de litio, tri(sec-butil)borohidruro de litio, disopinocampiteilcianoborohidruro de sodio, borano de catecol, tetrahidrofurano de borano, borohidruro de sodio, borohidruro de potasio, borohidruro de litio, paladio en la presencia del gas de hidrógeno, borano de 5-etil-2-metilpiridina (PEMB - 5-ethyl-2-methylpyridine borane), borano de 2-picolina o triacetoxiborohidruro apoyado por polímeros. En algunas secciones, cualquiera de los compuestos ya mencionados, y preferiblemente el cianoborohidruro de sodio es utilizado en combinación con un aditivo de titanio (IV), un agente deshidratador, o un aditivo de haluro de zinc. En algunas secciones, el agente reductor es un cianoborohidruro o un triacetoxiborohidruro de tetra(alquilo C1-4)amonio, un cianoborohidruro o un triacetoxiborohidruro de un metal, o un cianoborohidruro o un triacetoxiborohidruro alcalinotérreo. En algunas secciones, el agente reductor es un cianoborohidruro de un metal alcalino. En algunas secciones, el agente reductor es seleccionado de cianoborohidruro de sodio y triacetoxiborohidruro de sodio. En algunas secciones, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. Tal como se utiliza aquí, un aditivo de titanio (IV) es un ácido Lewis que contiene un metal de titanio (IV) (por ejemplo, tetracloruro de titanio, isopropóxido de titanio, etóxido de titanio, y similares).

En algunas secciones, el proceso comprende además la desprotección de un compuesto de la Fórmula II o una de sus sales ya mencionadas, para formar un compuesto de la Fórmula I:



o una de sus sales.

En algunas secciones, el compuesto de la Fórmula I es producido inicialmente como una base libre de la forma de base libre del compuesto de la Fórmula II.

En algunas secciones, la desprotección involucra reaccionar al compuesto de la Fórmula II con un agente de desprotección adecuado. En algunas secciones, la desprotección comprende un tratamiento con eterato de trifluoruro de boro, seguido de un tratamiento con hidróxido de amonio acuoso. En algunas secciones, la desprotección es ejecutada en un solvente adecuado a una temperatura menor o igual a 30 °C, menor o igual a 20 °C, menor o igual a 10 °C o menor o igual a 5 °C. En algunas secciones, el solvente adecuado es acetonitrilo.

En algunas secciones, el proceso de desprotección del compuesto de la Fórmula II para formar al compuesto de la Fórmula I, comprende además la reacción del compuesto de la Fórmula I con ácido adípico para formar la sal de adipato.

5 En algunas secciones, el proceso comprende además:

(a) calentar al compuesto de la Fórmula I en metanol a reflujo para formar una mezcla;

10 (b) después de (a), agregar cetona de metilisobutilo a la mezcla;

(c) después de (b), remover una porción del solvente por medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;

15 (d) después de (c), agregar metanol a la mezcla concentrada para formar una mezcla diluida;

(e) después de (d) calentar a la mezcla disuelta a reflujo para formar una mezcla;

(f) después de (e) agregar cetona de metilisobutilo a la mezcla;

20 (g) después de (f), remover una porción de solvente por medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;

(h) después de (g), agregar ácido adípico y metanol a la mezcla concentrada;

25 (i) después de (h), calentar a la mezcla para que haga reflujo; y

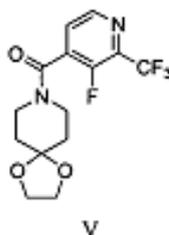
(j) después de (i), remover una porción del solvente por medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;

30 (k) después de (j), agregar heptano a la mezcla; y

(l) después de (k), agitar a la mezcla a la temperatura del cuarto para formar la sal del ácido adípico del compuesto de la Fórmula I.

35 El tratamiento del compuesto de la Fórmula II para remover al grupo P<sup>1</sup> puede lograrse por métodos conocidos en la industria para la remoción de grupos protectores específicos tales como aquellos en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica), 4<sup>ta</sup> ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey, páginas 696-887 (y, en específico, las páginas (872-887) (2007), la cual está incorporada totalmente en este documento por referencia. Por ejemplo, en algunas secciones, el grupo P<sup>1</sup> es removido al tratarse con un ion de fluoruro (por ejemplo, tratar con fluoruro de tetrabutilamonio), ácido clorhídrico, ácido p-toluenosulfónico de piridinio (PPTS - pyridinium p-toluenesulfonic acid), o un ácido de Lewis (por ejemplo, tetrafluoroborato de litio)). En algunas secciones, el tratamiento es un tratamiento de tetrafluoroborato de litio, seguido por un tratamiento de hidróxido de amonio (por ejemplo, cuando P<sup>1</sup> es 2-(trimetilsilil)etoximetilo). En algunas secciones, el tratamiento comprende tratar con una base (por ejemplo, P<sup>1</sup> es un N-pivaloiloximetilo). En algunas secciones, la base es un hidróxido de un metal alcalino. En algunas secciones, la base es hidróxido de sodio. En algunas secciones, la base es un hidróxido de metal alcalino. En algunas secciones, la base es hidróxido de sodio. En algunas secciones, el tratamiento comprende el tratar con hidróxido de sodio o amonio en un solvente tal como metanol o agua.

50 En algunas secciones, el compuesto de la Fórmula IV, o una de sus sales, es producido por un proceso que comprende la desprotección de un compuesto de la Fórmula V:



o una de sus sales.

65 En algunas secciones, el compuesto de la Fórmula V es utilizado preferiblemente como una base libre y el compuesto de la Fórmula IV es producido preferiblemente en forma de una base libre.

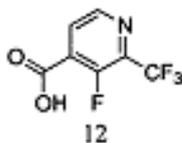
En algunas secciones, la desprotección comprende la reacción con un ácido acuoso.

En algunas secciones, el ácido es un ácido hidroclicórico.

5 En algunas secciones, un exceso de ácido acuoso es utilizado en relación del compuesto de la Fórmula V. en algunas secciones, un exceso de 5, 6, 7, 8, 9, o 10 equivalentes o más ácidos acuosos es utilizado en relación al compuesto de la Fórmula V. En algunas secciones, un exceso de 6, 7, 8, 9, o 10 equivalentes o más de un ácido acuoso son utilizados en relación al compuesto de la Fórmula V. En algunas secciones, un exceso de 7, 8, 9, o 10 equivalentes o más de ácido acuoso es utilizado en relación al compuesto de la Fórmula V. En algunas secciones, un exceso de 8, 9, o 10 equivalentes o más de ácido acuoso es utilizado en relación al compuesto de la Fórmula V. En algunas secciones, un exceso de 9 o 10 equivalentes o más de ácido acuoso es utilizado en relación al compuesto de la Fórmula V. En algunas secciones, la desprotección es ejecutada en un solvente de acetonitrilo a una temperatura que es menor o igual que 30 °C, menor o igual que 20 °C, menor o igual que 10 °C o menor o igual que 5 °C.

15 Otras condiciones de desprotección apropiadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en Síntesis Orgánica), 4ª ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey, páginas 696-887 (y en particular, las páginas 872-887) (2007), la cual es incorporada completamente en este documento por referencia.

20 En algunas secciones, el compuesto de la Fórmula V es producido mediante un proceso que comprende la reacción de un compuesto de la Fórmula VI:



VI

25 o una de sus sales, con un compuesto de la Formula VII:



40 o una de sus sales, en la presencia de un agente acoplador.

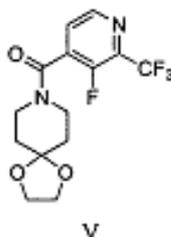
45 Agentes acopladores apropiados son cualquiera de los agentes de acoplamiento bien conocidos para la vinculación de aminas a un ácido para formar una amina. Ejemplos no limitantes incluyen a carbodiimidas (por ejemplo, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil, o dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (clorhidrato de EDC)) carbodiimida (EDC), o 1,1'-carbonildiimidazol (CDI)), un reactivo de carbodiimidas en la presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o su hidrato, agentes de acoplamiento que se basan en fosfonio (por ejemplo, hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfonio (BOP - benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate), (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP - benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris-pirrolidinofosfonio (PyAOP - 7-azabenzotriazol-1-yloxy)-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio (PyBrOP - bromotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate), cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BOPCl - bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride)), reactivos que se basan en el aminio (por ejemplo, hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato de 3-(dietilfosforiloxi)-1,2,3-benzotriacín-4(3H)-ona (DEPBT), O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HCTU), y tetrafluoroborato O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TATU)), reactivos que se basan en el uronio (tetrafluoroborato de O-(5-norborneno-2,3-dicarboximido)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TNTU), y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), tetrafluoroborato de O-(3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriacín-3-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TDBTU)), tetrafluoroborato de O-(1,2-dihidro-2-oxo-

1-piridil-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TPTU), o tetrafluoroborato de O-[(etoxicarbonil)ciano-metileneamino]-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TOTU)), otros reactivos incluyen, pero no se limitan a, 3-(dietilfosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT), hexafluorofosfato de carbonildiimidazol (CDI), N,N,N',N'-tertmetilcloroformamidio (TCFH), o una solución propilfosfónica anhídrida. En algunas secciones, el agente acoplador es hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP - benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate).

En algunas secciones, los compuestos de las Fórmulas V, VI y VII están, preferiblemente, en formas que no sean de sales.

En algunas secciones, la reacción del compuesto de la Fórmula VI y VII se ejecuta en la presencia de una amina terciaria (por ejemplo, trietilamina). En algunas secciones, la reacción es ejecutada en dimetilformamida (DMF) a una temperatura que es menor o igual que 30 °C, menor o igual que 20 °C o menor o igual que 15 °C. En algunas secciones, el agente de acoplamiento está presente en más o igual que 1.05, más o igual que 1.1 o más que igual que 1.2 equivalentes en relación al compuesto de la Fórmula VI.

Este invento también suministra un compuesto de la Fórmula V:



o una de sus sales, con un intermediador útil en los procesos ya descritos.

En algunas secciones, el compuesto de la Fórmula V es una base libre.

Los procesos descritos en este documento pueden ser monitoreados de acuerdo a cualquier método adecuado conocido en la industria. Por ejemplo, la formación de productos puede monitorearse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopia por medio de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia con infrarrojos, o espectrofotometría (por ejemplo, con luz ultravioleta visible); o por medio de cromatografía tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC - high performance liquid chromatography) o cromatografía de capas delgadas (TLC - thin layer chromatography) u otras técnicas relacionadas.

Tal como se utiliza aquí, el término "reaccionar" es utilizado como se conoce en la industria y generalmente se refiere al juntar a 2 reactivos químicos de tal forma que permita su interacción a un nivel molecular para lograr una transformación química o física. En algunas secciones, el reaccionar involucra a 2 reactivos, donde uno o más equivalentes del 2º reactivo son utilizados en relación al primer reactivo. Los pasos de reacción de los procesos aquí descritos pueden ser conducidos durante cierto tiempo específico y bajo condiciones adecuadas para preparar al producto identificado.

La preparación de compuestos puede involucrar la protección y desprotección de varios grupos químicos. La necesidad para la protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados puede determinarse fácilmente por una persona con conocimiento en la industria. La química de los grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis (Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica), 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007, la cual está incorporada completamente en este documento por referencia. Ajustes a los grupos protectores y los métodos de formación y división aquí descritos pueden cambiarse como sea necesario como consecuencia del uso de varios sustituyentes.

Las reacciones de los procesos aquí descritos pueden ejecutarse en solventes adecuados que pueden ser seleccionados fácilmente por una persona con conocimiento en la industria de síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales iniciales (reactores), los intermediadores, o los productos a temperaturas en las cuales las reacciones son ejecutadas, por ejemplo, las temperaturas pueden variar desde la temperatura de congelamiento del solvente y la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción específica puede ejecutarse en un solvente o en una mezcla de más de un solvente. Dependiendo del paso específico de reacción, pueden seleccionarse solventes adecuados para un paso específico de reacción. En algunas secciones, las reacciones pueden ser ejecutadas en la ausencia de un solvente, tal como cuando por lo menos un reactivo es un líquido o un gas.

Solventes adecuados suelen incluir a solventes halogenados tales como tetracloruro, bromodichlorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano,  $\alpha,\alpha,\alpha$ -

trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1,2-dibromoetano, hexafluorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,2-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, sus mezclas y similares.

5 Solventes de éter adecuados incluyen: dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, éter dietílico, éter dimetílico de etilenglicol, éter dietílico de etilenglicol, éter dimetílico de dietilenoglicol, éter etílico de dietilenoglicol, éter dimetílico de trietilenoglicol, anisol, éter metílico de t-butilo, sus mezclas y similares.

10 Solventes próticos adecuados pueden incluir, en forma de ejemplo y sin limitación, a agua, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilenglicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol i-butílico, alcohol t-butílico, 2-etoxietanol, dietilenoglicol, 1-, 2-, o 3- pentanol, alcohol neo-pentílico, alcohol t-pentílico, éter monometílico de dietilenoglicol, éter monoetílico de dietilenoglicol, ciclohexanol, alcohol bencílico, fenol, o glicerol.

15 Solventes apróticos adecuados pueden incluir, en forma de ejemplo y sin limitación, a tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo, sulfóxido dimetilo, propionitrilo, formato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etilmethylcetona, acetato de etilo, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, tetrametilurea, nitrometano, nitrobenceno, o hexametilfosforamida.

20 Solventes de hidrocarburos adecuados incluyen a benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o-, o p-xileno, octano, indano, nonano, o naftaleno.

25 Las reacciones de los procesos aquí descritos pueden ejecutarse a temperaturas apropiadas que pueden determinarse fácilmente por una persona con conocimiento en la industria. Las temperaturas de reacción dependerán de, por ejemplo, los puntos de derretimiento y de ebullición de los reactivos y de los solventes, si estuviesen presentes; la termodinámica de la reacción (por ejemplo, las reacciones vigorosamente esotéricas podrían necesitar ser ejecutadas a temperaturas reducidas); y la cinética de la reacción (por ejemplo, una barrera alta de energía de activación podría necesitar temperaturas elevadas). "Temperatura elevada" se refiere a temperaturas por sobre la temperatura del cuarto (alrededor de 22 °C).

30 Las reacciones de los procesos aquí descritos pueden ejecutarse en el aire o bajo una atmósfera inerte. Comúnmente, la reacciones que contienen a reactivos o productos que son sustancialmente reactivos con el aire pueden ejecutarse utilizando técnicas sintéticas sensibles al aire que son bien conocidas por personas con conocimiento la industria.

35 En algunas secciones, la preparación de los compuestos podría involucrar la adición de ácidos o bases para aceptar, por ejemplo, la catálisis de una reacción o formación deseada de formas salinas tales como sales para su adición a ácidos.

40 Ejemplos de ácidos pueden ser ácidos inorgánicos u orgánicos. Ácidos inorgánicos incluyen al ácido hidrocórico, el ácido hidrobromico, al ácido sulfúrico, al ácido fosfórico, y al ácido nítrico. Ácidos orgánicos incluyen al ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido benzoico, ácido 4-nitrobenzico, ácido metanesulfónico, ácido p-toluenesulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido tartárico, ácido trifluoroacético, ácido propiólico, ácido butírico, ácido 2-butinóico, ácido acético de vinilo, ácido pentanóico, ácido hexanóico, ácido heptanóico, ácido octanóico, ácido nonanóico y ácido decanóico.

45 Bases de ejemplo incluyen a hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de litio, carbonato de sodio y carbonato de potasio. Algunos ejemplos de bases fuertes incluyen, pero no se limitan a, hidróxido, alcóxidos, amidas metálicas, hidruro metálicos, dialquilamidas y arilaminas metálicas donde; los alcóxidos incluyen a sales de litio, sodio y potasio de óxidos de metilo, etilo y t-butilo; las amidas metálicas incluyen a amida de sodio, amida de potasio y amida de litio; los hidruros metálicos incluyen a hidruro de sodio, hidruro de potasio y a hidruro de litio; y las dialquilamidas metálicas incluyen a la sales de sodio y potasio de amidas sustituidas con metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, trimetilsililo y ciclohexilo.

50 Los intermediarios y los productos también pueden incluir a sales de los compuestos aquí descritos. Tal como se utiliza en este documento, el término "sal" se refiere a una sal formada por la adición de un ácido o base aceptable a un compuesto aquí presentado. En algunas secciones, las sales son sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en este documento, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es aceptable para su uso en aplicaciones farmacéuticas desde un punto de vista toxicológico y no interactúa adversamente con el ingrediente activo. La sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo a mono- y bi- sales, incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, pero sin limitarse a, ácidos acéticos, lácticos, cítricos, cinámicos, tartáricos, succínicos, fumáricos, maléicos, malónicos, mandélicos, málicos, oxálicos, propiónicos, hidrocóricos, hidrobromicos, fosfóricos, nítricos, sulfúricos, glicólicos, pirúvicos, metanosulfónicos, etanosulfónicos, toluenosulfónicos, salicílicos, benzóicos, y ácidos conocidos similarmente aceptables. Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de

Remington), 17<sup>ma</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science (Revista de Ciencia Farmacéutica), 66, 2 (1977), cada una de las cuales están incorporadas completamente en este documento por referencia.

5 Cuando se ejecuta la preparación de los compuestos de acuerdo a los procesos aquí descritos, las operaciones usuales de aislamiento y purificación tales como concentraciones, filtraciones, extracciones, extracciones de la fase sólida, re - cristalizaciones, cromatografía, y similares pueden ser utilizados para aislar a los productos deseados.

10 En algunas secciones, los compuestos del invento, y sus sales, son sustancialmente aislados. El término "sustancialmente aislados" significa que el compuesto está separado, por lo menos parcialmente, o sustancialmente, del entorno en el cual se formó o se detectó. La separación parcial podría incluir, por ejemplo, a una composición enriquecida en el compuesto del invento. Una separación sustancial puede incluir a composiciones que se contienen por lo menos alrededor del 50%, por lo menos alrededor del 60%, por lo menos alrededor del 70%, por lo menos alrededor del 80%, por lo menos alrededor del 90%, por lo menos alrededor del 95%, por lo menos alrededor del 97%, o por lo menos alrededor del 99% de la masa del compuesto del invento, o una de sus sales. Los métodos para aislar a los compuestos y a sus sales son rutinarios en la industria.

#### Usos

20 El compuesto de la Fórmula I, {1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]acetidin-3-il]acetonitrilo, es un inhibidor de JAK (por ejemplo, JAK1, JAK2). Los inhibidores de JAKs son útiles para el tratamiento de varias enfermedades o trastornos asociados con JAKs. Ejemplos de enfermedades asociadas con JAKs incluyen a enfermedades que involucran al sistema inmunológico incluyendo, por ejemplo, el rechazo de trasplantes de órganos (un ejemplo, el rechazo de aloinjertos y la enfermedad de injertos versus el anfitrión). Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAKs incluyen enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la artritis juvenil, la artritis psoriásica, la diabetes de tipo I, el lupus, la psoriasis, la enfermedad de intestinos inflamatorios, la colitis ulcerativa, la enfermedad de Crohn, miastenia gravis, nefropatías de la inmunoglobulina, miocarditis, enfermedades autoinmunes de la tiroides, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD - chronic obstructive pulmonary disease), y similares. En algunas secciones, la enfermedad autoinmune es una enfermedad autoinmune cutánea de la piel tal como el pénfigo vulgar (PV) o el pénfigoide ampuloso (BP - bullous pemphigoid).

35 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAKs incluyen a condiciones alérgicas tales como el asma, alergias a las comidas, dermatitis eccematosa, dermatitis de contacto, dermatitis atópica (eczema atópico), y rinitis. Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAKs incluyen enfermedades virales tales como el virus de Epstein Barr (EBV - Epstein Barr Virus), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus varicela-Zoster (VZV) y el virus del papiloma humano (HPV - Human Papilloma Virus).

40 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAKs incluyen a enfermedades asociadas con la rotación del cartílago, por ejemplo, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, el síndrome de Tietze, atropatía del cartílago costal, osteoartritis deformante endémica, la enfermedad de Meleni, la enfermedad de Handigodu, la degeneración que resulta de fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, escleroderma o espondilitis anquilosante.

45 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAKs incluyen a malformaciones congénitas del cartílago, incluyendo a la condrodisplasia, condrodiasplasias, y pseudocondrodiasplasias (por ejemplo, microtia, entotia y lacondrodiasplasia metafisaria).

50 Ejemplos adicionales de enfermedades o condiciones asociadas con JAKs incluyen enfermedades de la piel tales como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgaris), dermatitis atópica, sarpullido en la piel, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto o dermatitis alérgica de contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias incluyendo algunas sustancias farmacéuticas cuando se aplican tópicamente pueden causar la sensibilización de la piel. En algunas secciones, la administración conjunta o secuencial de por lo menos un inhibidor de JAKs del invento junto con el agente que causa la sensibilización no deseada puede ser útil para el tratamiento de aquella sensibilización no deseada o de la dermatitis. En algunas secciones, la enfermedad de la piel es tratada por medio de la administración tópica de por lo menos un inhibidor de JAKs del invento.

60 Ejemplos adicionales de enfermedades o condiciones asociadas con JAKs incluyen aquellas que se caracterizan por tumores sólidos (por ejemplo, el cáncer de la próstata, el cáncer renal, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer gástrico, el cáncer a las mamas, el cáncer al pulmón, los cánceres de la cabeza y del cuello, el cáncer de las tiroides, el glioblastoma, el sarcoma de Kaposi, la enfermedad de Castleman, el leiomiomasarcoma uterino, el melanoma, etcétera), cánceres hematológicos (por ejemplo, el linfoma, la leucemia tal como la leucemia linfoblástica aguda (ALL - acute lymphoblastic leukemia), la leucemia mielógena aguda (AML - acute myelogenous leukemia) o la mieloma múltiple), y cáncer de la piel tal como el linfoma cutáneo de células T (CTCL - cutaneous T-cell lymphoma) y el linfoma cutáneo de células B. CTCLs de ejemplo incluyen al síndrome de Sezary y a la micosis fungoide. Otros ejemplos de enfermedades o condiciones asociadas con JAKs incluyen a la hipertensión arterial pulmonar.

- 5 Otros ejemplos de enfermedades o condiciones asociadas con JAKs incluyen a cánceres asociados con inflamaciones. En algunas secciones, el cáncer es asociado con la enfermedad inflamatoria de intestinos. En algunas secciones, la enfermedad inflamatoria de intestinos es colitis ulcerativa. En algunas secciones, la enfermedad inflamatoria de intestinos es la enfermedad de Crohn. En algunas secciones, el cáncer asociado con inflamaciones es el cáncer asociado con la colitis. En algunas secciones, el cáncer asociado con inflamaciones es cáncer al colon o cáncer colorrectal. En algunas secciones, el cáncer es cáncer gástrico, un tumor intestinal carcinoide, un tumor gastrointestinal estromal (GIST - gastrointestinal stromal tumor), adenocarcinoma, cáncer del intestino delgado o cáncer rectal.
- 10 Enfermedades asociadas con JAKs también pueden incluir aquellas caracterizadas por la expresión de: mutaciones de JAK2 tales como aquellas que tienen por lo menos una mutación en el dominio de pseudo-quinasa (por ejemplo, JAK2V617F); mutaciones de JAK2 que tienen por lo menos una mutación fuera del dominio de las pseudo-quinasa; mutaciones de JAK1; mutaciones de JAK3; mutaciones de los receptores de eritropoyetina (EPOR - erythropoietin receptor); o la expresión desregulada de CRLF2.
- 15 Las enfermedades asociadas con JAKs pueden incluir además a enfermedades mieloproliferativas (MPDs - myeloproliferative disorders) tales como la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (ET - essential thrombocythemia), la mielofibrosis con metaplasia mielóide (MMM), la mielofibrosis primaria (PMF - primary myelofibrosis), la leucemia mielógena crónica (CML - chronic myelogenous leukemia), la leucemia mielomonocítica crónica (CMML - chronic myelomonocytic leukemia), el síndrome hipereosinofílico (HES - hypereosinophilic syndrome), la enfermedad de los mastocitos sistémicos (SMCD - systemic mast cell disease), y similares. En algunas secciones, la enfermedad mieloproliferativa es mielofibrosis (por ejemplo, la mielofibrosis primaria (PMF - primary myelofibrosis) o la post-policitemia vera/mielofibrosis de trombocitemia esencial (Post-PV/PostET MF - post polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis)) en algunas secciones, la enfermedad mieloproliferativa es la post-mielofibrosis de trombocitemia esencial (PostET MF - post- essential thrombocythemia myelofibrosis). En algunas secciones, la enfermedad mieloproliferativa es la mielofibrosis post-policitemia vera (Post-PV MF - post polycythemia vera myelofibrosis).
- 20
- 25
- 30 Otros ejemplos de enfermedades y condiciones asociadas con JAKs incluyen el alivio de los efectos colaterales dermatológicos de otros fármacos por medio de la administración del compuesto del invento. Por ejemplo, muchos agentes farmacéuticos resultan en reacciones alérgicas no deseadas que pueden manifestarse en forma de sarpullido tipo acné o una dermatitis relacionada. Ejemplos de agentes farmacéuticos que tienen aquellos efectos colaterales no deseados incluyen a medicamentos contra el cáncer tales como gefitinib, cetuximab, erlotinib, y similares. Los compuestos del invento pueden administrarse sistémicamente o tópicamente (por ejemplo, ubicándolo cerca de la dermatitis) en combinación con (por ejemplo, simultáneamente o secuencialmente) el agente farmacéutico que tiene el efecto colateral dermatológico no deseado. En algunas secciones, el compuesto del invento puede administrarse tópicamente junto con uno o más agentes farmacéuticos adicionales, donde el otro agente farmacéutico, cuando se lo aplica tópicamente, en la ausencia de un compuesto del invento causa una dermatitis de contacto, una sensibilización alérgica de contacto o una enfermedad dérmica similar. Asimismo, las composiciones del invento incluyen a formulaciones tópicas que contienen el compuesto del invento y un agente farmacéutico adicional que puede causar dermatitis, enfermedades de la piel o efectos colaterales relacionados.
- 35
- 40
- 45 Enfermedades adicionales asociadas con JAKs incluyen a inflamaciones y enfermedades inflamatorias. Ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen a la sarcoidosis, a enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis o enfermedades relacionadas), enfermedades inflamatorias de la tráquea respiratoria (por ejemplo, la tráquea respiratoria superior incluyendo la nariz y los senos nasales tales como la rinitis o la sinusitis o la tráquea respiratoria inferior incluyendo la bronquitis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y similares), miopatías inflamatorias tales como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias. En algunas secciones, la enfermedad inflamatoria del ojo es blefaritis.
- 50
- 55 Enfermedades adicionales asociadas con JAKs incluyen a lesiones por reperfusión isquémica o a una enfermedad o condición relacionada a un evento inflamatorio isquémico tal como un infarto, un paro cardíaco, el estado de enfermedad controlado por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de cirugías de bypass o estados crónicos de endotoxinas que contribuyen a una falla cardíaca crónica), anorexia, caquexia, fatiga tal como aquella que resulta de, o que se asocia con, el cáncer, la restenosis, la esclerodermatitis, la fibrosis, condiciones asociadas con la hipoxia o la astrogliosis tales como, por ejemplo, la retinopatía diabética, el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, y otras enfermedades inflamatorias tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS - systemic inflammatory response syndrome) y el choque séptico.
- 60
- 65 Otras enfermedades asociadas con JAKs incluyen a la gota y al tamaño incrementado de la próstata debido a, por ejemplo, una hipertrofia prostática benigna o a una hiperplasia prostática benigna, así como enfermedades de resorción ósea tales como la osteoporosis o la osteoartritis, enfermedades de resorción ósea asociadas con: desbalances hormonales y/o terapias hormonales, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, sarcoidosis ósea) o cáncer (por ejemplo, el mieloma).

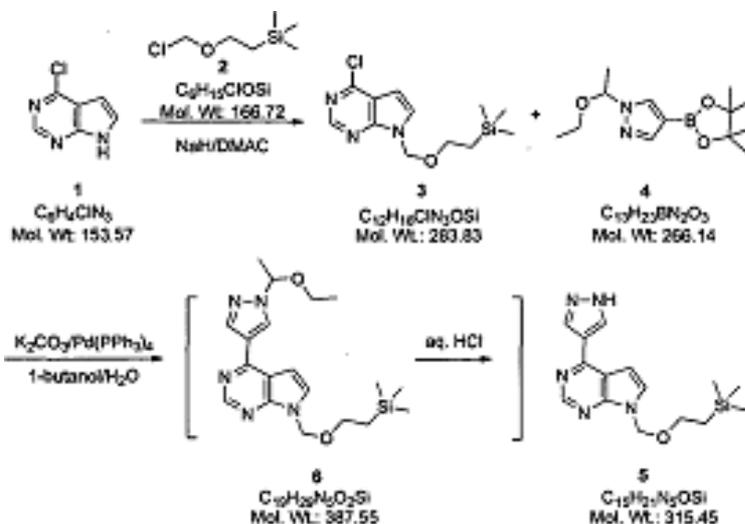
Otras enfermedades asociadas con JAKs incluyen a la enfermedad de ojo seco. Tal como se utiliza aquí, la "enfermedad de ojo seco" tiene el propósito de abarcar los estados de enfermedad resumidos en un informe oficial reciente de la Conferencia del Ojo Seco (DEWS - Dry Eye Workshop), que definió al ojo seco como "a multifactorial disease of the tears and ocular surface that results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface. It is accompanied by increased osmolarity of the tear film and inflammation of the ocular surface" ("una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que resulta en síntomas de incomodidad, perturbación visual e inestabilidad de la lámina lacrimal con un daño potencial a la superficie ocular. Está acompañada de una osmolaridad incrementada de la lámina lacrimal e inflamación de la superficie ocular". Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop" (La Definición y Clasificación de la Enfermedad de Ojo Seco: Informe del Subcomité de Clasificación y Definición de la Conferencia Internacional del Ojo Seco"), The Ocular Surface (La Superficie Ocular), 5(2), 75-92 abril 2007, que está incorporada completamente en este documento por referencia. En algunas secciones, la enfermedad de ojo seco es seleccionada de ojo seco por deficiencia lacrimal acuosa (ADDE - aqueous tear-deficient dry eye) o la enfermedad de ojo seco por evaporación, o sus combinaciones apropiadas. En algunas secciones, la enfermedad de ojo seco es el ojo seco del síndrome de Sjogren (SSDE - Sjogren syndrome dry eye). En algunas secciones, la enfermedad de ojo seco es el ojo seco que no pertenece al síndrome de Sjogren (NSSDE - non-Sjogren syndrome dry eye).

Otras enfermedades asociadas con JAKs incluyen a la conjuntivitis, la uveítis (incluyendo la uveítis crónica), la coroiditis, la retinitis, la ciclitis, la escleritis, la epiescleritis o la iritis. Otras enfermedades asociadas con JAKs incluyen la disfunción respiratoria o la falla asociada con una infección viral, tal como la influenza y el SARS.

### Ejemplos

El invento será descrito en mayor detalle en forma de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos son ofrecidos para propósitos ilustrativos, y no es su intención el limitar al invento de ninguna manera. Aquellas personas con conocimiento en la industria reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden ser cambiados o modificados para generar esencialmente los mismos resultados.

#### Ejemplo 1. La síntesis de 4-(1H-pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (5)



#### Paso 1. 4-Cloro-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (3)

A un matraz equipado con una entrada de nitrógeno, un embudo de adición, un pozo térmico, y un agitador mecánico se le agregó 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1, 600 g, 3.91 mol) y N,N-dimetilacetimida (DMAC, 9.6 L) a la temperatura del cuarto. La mezcla se enfrió a 0-5 °C en un baño de hielo/salmuera antes de que se agregara hidruro de sodio (NaH, 60 % de masa, 174 g, 4.35 mol, equivalente a 1.1) en porciones a 0-5 °C. La mezcla de la reacción se convirtió en una solución oscura después de 15 minutos. Se agregó lentamente cloruro de trimetilsililetoximetilo (2, SEM-Cl, 763 mL, 4.31 mol, equivalente a 1.1) por medio de un embudo de adición a una tasa a la cual la temperatura de la reacción interna no excedió los 5 °C. La mezcla de la reacción fue agitada entonces a 0-5 °C durante 30 minutos. Cuando se estimó que la reacción estaba completa por medio de la TLC y de la HPLC, la mezcla de la reacción fue neutralizada con agua (1 l). La mezcla fue diluida entonces con agua (12 l) y éter terc-butílico de metilo (MTBE - methyl *tert*-butyl ether) (8 l). Las 2 capas fueron separadas y la capa acuosa fue extraída con MTBE (8 l). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua (2 x 4L) y salmuera (4 l) y el solvente fue cambiado a 1-butanol. La solución del producto crudo (3) en 1-butanol fue usada en la reacción de

5 acoplamiento Suzuki subsiguientemente sin más purificaciones. Alternamente, la solución orgánica del producto  
 crudo (3) en MTBE fue secada sobre sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los solventes fueron removidos bajo presión  
 reducida. El residuo fue disuelto entonces en heptano (2 l), filtrado y cargado en una columna de gel de sílice (SiO<sub>2</sub>,  
 3.5 Kg) eluyéndose con heptano (6 l), un 95% de heptano/acetato etílico (2 l), un 90% de heptano/acetato etílico (10  
 10 l), y finalmente un 80% de heptano/acetato etílico (10 l). Las fracciones que contenían el producto deseado puro  
 fueron combinadas y concentradas bajo presión reducida para generar 4-cloro-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-  
 pirrolo[2,3-d]pirimidina (3, 987 g, 1109.8 g teóricamente, 88.9% de generación) en forma de un aceite amarillo claro  
 que se solidificó parcialmente a un sólido aceitoso mientras se encontraba en reposo a la temperatura del cuarto.  
 Para 3: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 8.67 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, J = 3.8 Hz), 6.71 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 5.63 (s, 2H),  
 3.50 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 0.80 (t, 2H, J = 8.1 Hz), 1.24 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) δ 151.3, 150.8,  
 150.7, 131.5, 116.9, 99.3, 72.9, 65.8, 17.1, -1.48 ppm; C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>CIN<sub>3</sub>OSi (MW 283.83), LCMS (EI) m/e 284/286 (M<sup>+</sup> +  
 H).

15 *Paso 2. 4-(1H-Pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (5)*

20 A un reactor equipado con un agitador superior, un condensador, un pozo térmico y una entrada de nitrógeno se  
 cargó agua (H<sub>2</sub>O, 9.0 L), carbonato de potasio sólido (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4461 g, 32.28 mol, equivalente a 2.42), 4-cloro-7-((2-  
 (trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (3, 3597 g, 12.67 mol), 1-(1-etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-  
 dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (4, 3550 g, 13.34 mol, equivalente a 1.05), y 1-butanol (27 L) a la temperatura del  
 25 cuarto. La mezcla de reacción resultante fue desgasificada rellenándose 3 veces con nitrógeno, cada vez antes de  
 tratarse con tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 46 g, 0.040 mol, equivalente a 0.003) a la temperatura del  
 cuarto. La mezcla resultante de la reacción fue calentada para lograr un reflujo moderado (alrededor de 90 °C)  
 durante 1-4 horas. Cuando se estimó que la reacción estaba completa por medio de la determinación de la HPLC, la  
 30 mezcla de la reacción fue enfriada gradualmente a la temperatura del cuarto antes de ser filtrada a través de una  
 capa de diatomita. La capa de diatomita fue lavada con acetato etílico (2 x 2 l) antes de que las filtraciones y la  
 solución de enjuague se combinaran. Las 2 capas fueron separadas, y la capa acuosa fue extraída con acetato  
 etílico (12 l). Las capas orgánicas combinadas fueron concentradas bajo presión reducida para remover los  
 solventes, y la 4-(1-(1-etoxietil)-1H-pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina cruda (6) fue  
 cargada de vuelta directamente al reactor con tetrahidrofurano (THF, 4.2 L) para la subsiguiente reacción de  
 desprotección promovida por ácidos sin más purificaciones.

35 A una suspensión de la 4-(1-(1-etoxietil)-1H-pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina cruda  
 (6), hecha tal como se describió anteriormente, en tetrahidrofurano (THF, 4.2 L) en el reactor se le agregó agua  
 (H<sub>2</sub>O, 20.8 L), y un 10% de la solución acuosa de HCl (16.2 L, 45.89 mol, equivalente a 3.44) a la temperatura del  
 40 cuarto. La mezcla resultante de la reacción fue agitada a 16-30 °C durante 2-5 horas. Cuando se estimó que la  
 reacción estaba completa mediante un análisis HPLC, la mezcla de la reacción fue tratada con una solución con un  
 30% de hidróxido de sodio acuoso (NaOH) (4 L, 50.42 mol, equivalente a 3.78) a la temperatura del cuarto. La  
 mezcla resultante de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 1-2 horas. Los sólidos fueron  
 recolectados por medio de filtración y lavados con agua (2 x 5 L). La torta húmeda fue cargada de vuelta al reactor  
 en acetonitrilo (21.6 litros), y la suspensión resultante fue calentada hasta obtener un reflujo moderado durante 1-2  
 45 horas. La solución transparente fue enfriada gradualmente a la temperatura del cuarto mientras se agitaba, y los  
 sólidos fueron precipitados fuera de la solución con el enfriamiento. La mezcla fue agitada a la temperatura del  
 cuarto durante 1-2 horas adicionales. Los sólidos fueron recolectados por medio de filtración, enjuagadas con  
 acetonitrilo (2 x 3.5 litros), y secados en un horno bajo presión reducida a 45-55 °C a una masa constante para  
 generar 4-(1H-pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (5, 3281.7 g, 3996.8 g  
 50 teóricamente, 82.1% de generación) en forma de sólidos blancos cristalinos (99.5 de porcentaje de área por medio  
 de HPLC). Para 5: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 13.41 (br. s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.67 (br. s, 1H), 8.35 (br. s, 1H), 7.72 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 7.10 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 5.61 (s, 2H), 3.51 (t, 2H, J = 8.2 Hz), 0.81 (t,  
 2H, J = 8.2 Hz), 0.13 (s, 9H) ppm; C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>OSi (MW, 315.45), LCMS (EI) m/z 316 (M<sup>+</sup> + H).

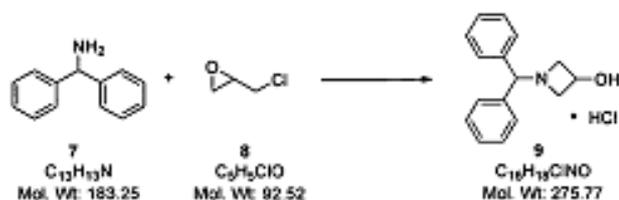
**Ejemplo 2. 3-(cianometileno)acetidin-1-carboxilato de terc-butilo (13)**

55

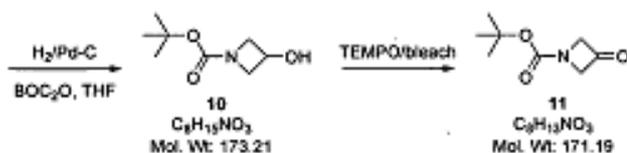
60

65

5

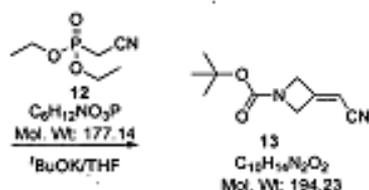


10



15

20



### 25 Paso 1. Hidrocloruro de 1-Benzhidrilacetidin-3-ol

Una solución de difenilmetanamina (7, 2737 g, 15.0 mol, equivalente a 1.04) en metanol (MeOH, 6 L) fue tratada con 2-(clorometil)oxirano (8, 1330 g, 14.5 mol) desde un embudo de adición a la temperatura del cuarto. Durante la adición inicial se notó una actividad endodérmica ligera. La mezcla resultante de la reacción fue agitada a la temperatura del cuarto durante 3 días antes de calentarse para generar un reflujo durante 3 días adicionales. Cuando el TLC mostró que la reacción fue considerada completa, la mezcla de la reacción fue enfriada primero a la temperatura del cuarto y luego a 0-5 °C en un baño de hielo. Los sólidos fueron recolectados por medio de filtraciones y lavados con acetona (4 l) para dar el primer lote del producto crudo deseado (9, 1516 g). La filtración fue concentrada bajo presión reducida y el semisólido resultante fue diluido con acetona (1 l). Este sólido fue recolectado entonces por medio de filtraciones para generar el 2º lote del producto crudo deseado (9, 221 g). El producto crudo, hidrocloruro de 1-benzhidrilacetidin-3-ol (9, 1737 g, 3998.7 g teóricamente, 43.4 % de generación), demostró ser lo suficientemente puro para ser utilizado en la reacción subsiguiente sin más purificaciones. Para 9: <sup>1</sup>HNMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz), δ 12.28 (br. d, 1H), 7.7 (m, 5H), 7.49 (m, 5H), 6.38 (d, 1H), 4.72 (br. s, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.85 (m, 2H) ppm; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClNO (base libre de 9, C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO MW, 239.31), LCMS (EI) *m/e* 240 (M<sup>+</sup> + H).

### 30 Paso 2. 3-hidroxiacetidin-1-carboxilato de tert-Butilo (10)

Una suspensión de hidrocloruro de 1-benzhidrilacetidin-3-ol (9, 625 g, 2.27 mol) en un 10% de solución de carbonato de sodio acuoso (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 L) y diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 L) se agitó a la temperatura del cuarto hasta que todos los sólidos fueron disueltos. Las 2 capas fueron separadas, y la capa acuosa fue extraída con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2L). Los extractos orgánicos combinados fueron secados sobre sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentrados bajo presión reducida. Esta base libre resultante cruda de 9 fue disuelta entonces en THF (6 l) y la solución fue colocada en una bomba Parr. Dicarbonato de Di-*tert*-butilo (BOC<sub>2</sub>O, 545 g, 2.5 mol, equivalente a 1.1) y un 20% de paladio (Pd) en carbono (125 g, 50% húmedo) fueron agregados a la bomba Parr. El envase fue cargado a 30 psi con gas de hidrógeno (H<sub>2</sub>) y agitado en una atmósfera constante de hidrógeno (el envase fue recargado 3 veces para mantener la presión a 30 psi) a la temperatura del cuarto durante 18 horas. Cuando el HPLC demostró que la reacción estaba completa (cuando no se pudo absorber más hidrógeno), la mezcla de la reacción fue filtrada a través de una almohadilla de diatomita y la almohadilla de diatomita fue enjuagada con THF (4 l). Las filtraciones fueron concentradas bajo presión reducida para remover el solvente y el residuo fue cargado en una columna de Biotage 150 con un monto mínimo de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La columna fue eluída con un 20-50% de acetato en el pico en heptano y las fracciones que contenían al producto puro deseado (10) fueron recaudadas y combinadas. Los solventes fueron removidos bajo presión reducida para generar al 3-hidroxiacetidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (10, 357 g, 393.2 g teóricamente, 90.8% de generación) en forma de un aceite incoloro, que se solidificó en reposo a la temperatura del cuarto al vacío. Para 10: <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ 4.56 (m 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ppm.

### 35 Paso 3. 3-oxoacetidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (11)

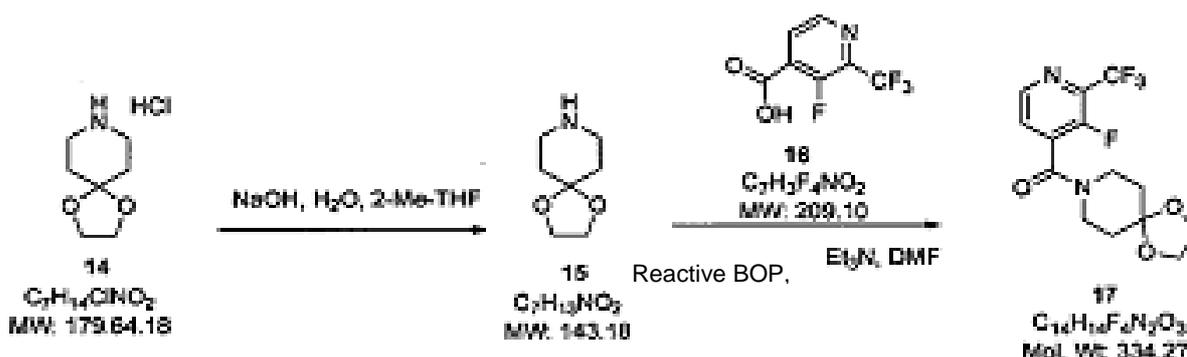
Una solución de 3-hidroxiacetidin-1-carboxilato de *tert*-butilo (10, 50 g, 289 mmol) en acetato etílico (400 ml) fue enfriada a 0 °C. La solución resultante fue tratada entonces con TEMPO sólido (0.5 g, 3.2 mmol, equivalente a

0.011) y una solución de bromuro de potasio (KBr, 3.9 g, 33.2 mmol, equivalente a 0.115) en agua (60 ml) a 0-5 °C. Mientras se mantuvo la reacción a una temperatura entre 0-5 °C se agregó una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>, 450 mL) y una solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaClO, 10 - 13 % de cloro disponible, 450 mL). Una vez que la solución de hipoclorito de sodio fue agregada, el color de la mezcla de la reacción cambió inmediatamente. Cuando el monto adicional de hipoclorito de sodio fue agregado, el color de la mezcla de la reacción se disipó gradualmente. Cuando el TLC mostró que todo el material de inicio fue consumido, el color de la mezcla de la reacción ya no cambió. La mezcla de la reacción fue diluida entonces con acetato etílico (EtOAc, 500 mL) y las 2 capas fueron separadas. La capa orgánica fue enjuagada con agua (500 mililitros) y la solución acuosa saturada de cloruro de sodio (500 ml) y secada sobre sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El solvente fue removido bajo presión reducida para generar el producto crudo, 3-oxoacetidin-1-carboxilato de terc- butilo (11, 48 g, 49.47 g teóricamente, 97% de generación), que demostró ser suficientemente puro y fue utilizado directamente en la reacción subsiguiente sin más purificaciones. Para el 11 crudo: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ 4.65 (s, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm.

#### Paso 4. 3-(cianometileno)acetidin-1-carboxilato de terc- butilo (13)

Se agregó fosfato cianometílico de dietilo (12, 745 g, 4.20 mol, equivalente a 1.20) y tetrahidrofurano anhídrido (THF, 9 L) a un matraz de 4 cuellos equipado con un pozo térmico, y un embudo de adición y el tubo de protección de nitrógeno a la temperatura del cuarto. La solución fue enfriada con un baño de hielo-metanol a -14 °C y se agregó 1.0 M de una solución de terc-butóxido de potasio (*t*-BuOK) en tetrahidrofurano anhídrido (THF, 3.85 L, 3.85 mol, equivalente a 1.1) durante 20 minutos manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de los -5 °C. La mezcla resultante de la reacción fue agitada durante 3 horas a -10 °C y una solución de 1-*tert*-butoxicarbonil-3-acetidinona (11, 600 g, 3.50 mol) en tetrahidrofurano anhídrido (THF, 2 L) fue agregada durante 2 horas manteniendo la temperatura interna por debajo de los -5 °C. La mezcla de la reacción fue agitada a -5 a -10 °C durante una hora y entonces se calentó lentamente a la temperatura del cuarto y se agitó a la temperatura del cuarto durante la noche. La mezcla de la reacción fue diluida en agua (4.5 litros) y una solución saturada de cloruro de sodio acuoso (NaCl, 4.5 L) y extraída con acetato etílico (EtOAc, 2 x 9 L). Las capas orgánicas combinadas fueron enjuagadas con salmuera (6 l) y secadas sobre sulfato de sodio anhídrido (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El solvente orgánico fue removido bajo presión reducida y el residuo fue diluido con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 L) antes de ser absorbido en gel de sílice (SiO<sub>2</sub>, 1.5 Kg). El producto crudo, que fue absorbido en el sílice, fue purificado por medio de cromatografía de columnas de destellos (SiO<sub>2</sub>, 3.5 Kg, 0 - 25% de elución gradiente de EtOAc/hexanos) para generar a 3-(cianometileno)acetidin-1-carboxilato de terc- butilo (13, 414.7 g, 679.8 g teóricamente, 61% de generación) en forma de un sólido blanco. Para 13: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), δ 5.40 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 4.61 (m, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm; C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 194.23), LCMS (EI) *m/e* 217 (M<sup>+</sup>+Na).

#### Ejemplo 3. (3-Fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (17)



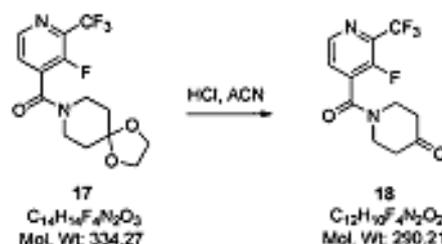
#### Paso 1. 1,4-Dioxa-8-azaspiro[4,5]decano (15)

A un reactor de 30 l equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición y un septum se cargó hidróxido de sodio (NaOH, 1.4 kg, 35 mol) y agua (7 L, 3.13 kg, 17.43 mol). A la solución obtenida se agregó ácido clorhídrico de 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decano (14, 3.13 kg, 17.43 mol). La mezcla fue agitada a 25 °C durante 30 minutos. Luego la solución fue saturada con cloruro de sodio (1.3 kilogramos) y extraída con 2-metil-tetrahidrofurano (3 x 7 L). La capa orgánica combinada fue secada con sulfato de sodio anhídrido (1.3 kilogramos), filtrada y concentrada bajo presión reducida (70 mmHg) a 50 °C. El aceite amarillo obtenido de esa forma fue destilado bajo presión reducida (80 mmHg, bp: 115 °C a 120 °C) para generar el compuesto 15 (2.34 kg, 16.36 mol, 93.8%) en forma de un aceite transparente, que fue utilizado directamente en una reacción subsiguiente de acoplamiento.

#### Paso 2. (3-Fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (17)

A un reactor seco de 100 l equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición, un termómetro y una salida al vacío se colocó ácido 3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotínico (**16**, 3.0 kg, 14.35 mol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloitris(dimetilamino)fosfonio (reactivo BOP, 7.6 kg, 17.2 mol, equivalente a 1.20) en dimetilformamida (DMF, 18 L). A la solución resultante se le agregó 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano (**15**, 2.34 kg, 16.36 mol, equivalente a 1.14) agitándose durante 20 minutos. Se agregó trietilamina (Et<sub>3</sub>N, 4 L, 28.67 mol, equivalente a 2.00) durante una hora. La temperatura fue mantenida entre 5 °C y 10 °C durante las adiciones. La solución café oscura obtenida de esa forma fue agitada durante 12 horas a 20 °C y luego enfriada a 10 °C. Con una agitación vigorosa, 18 l de una solución saturada de bicarbonato de sodio y 36 l de agua fueron agregadas secuencialmente y la temperatura se mantuvo bajo los 15 °C. La precipitación (torta de filtro) así obtenida fue recolectada por medio de filtraciones. La fase acuosa fue saturada entonces con 12 kg de cloruro de sodio sólido y extraída con EtOAc (2 x 18 L). La capa orgánica combinada fue enjuagada con una solución saturada de bicarbonato de sodio (18 l), y agua (2 x 18 l) secuencialmente. La torta de filtro de la filtración previa fue disuelta de vuelta a la fase orgánica. La solución café oscura así obtenida fue enjuagada 2 veces con 18 l de agua cada vez y concentrada entonces bajo presión reducida (40 - 50 °C, 30 mm Hg) para generar 5.0 kilogramos del producto crudo en forma de un aceite café viscoso. El producto crudo **17** obtenido como se acaba de indicar fue disuelto en EtOH (8.15 L) a 50 °C. Se agregó agua (16.3 litros) durante 30 minutos. La solución café fue sembrada, enfriada a 20 °C plante 3 horas con agitación y luego de eso agitada a 20 °C durante 12 horas. La precipitación formada fue filtrada, lavada una mezcla de EtOH y agua (EtOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 20, 2 L) y secada bajo presión reducida (50 mmHg) a 60 °C durante 24 horas para generar (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**17**, 3.98 kg, 11.92 mol, 83.1%) en forma de un polvo blanco. Para **17**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.68 Hz, 1 H, NCH en piridina), 7.92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.68 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4.68 Hz, 1 H, NCCH en piridina), 3.87-3.91 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.70 (br s, 2 H, uno de NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, uno de los dos NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, ambas en una posición axial), 3.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.86 Hz, 2 H, uno de los NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, el otro NCH<sub>2</sub> en el anillo de piperidina, ambos en la posición ecuatorial), 1.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.86 Hz, 2 H, uno de NCCH<sub>2</sub> en el anillo de piperidina, uno de otro NCCH<sub>2</sub> en el anillo de piperidina, ambos en la posición ecuatorial), 1.58 (br s, 2 H, uno de NCCH<sub>2</sub> en el anillo de piperidina, uno de otro NCCH<sub>2</sub> en el anillo de piperidina, ambos en la posición axial) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 161.03 (N-C=O), 151.16 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266.03 Hz, C-F), 146.85 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 4.32 Hz, NCH en piridina), 135.24 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 11.51 Hz, C-C=O), 135.02 (cuarteto, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 34.57 Hz, NC<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>), 128.24 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 7.48 Hz, NCCH en piridina), 119.43 (d x cuarteto, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274.38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4.89 Hz, CF<sub>3</sub>), 106.74 (OCO), 64.60 (OCO), 45.34 (NC en un anillo de piperidina), 39.62 (NC en un anillo de piperidina), 34.79 (NC en un anillo de piperidina), 34.10 (NC en un anillo de piperidina) ppm; <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ -64.69 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15.85 Hz, F<sub>3</sub>C), -129.26 (d x cuarteto, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15.85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 3.96 Hz, FC) ppm; C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MW, 334.27), LCMS (EI) *m/e* 335.1 (M<sup>+</sup> + H).

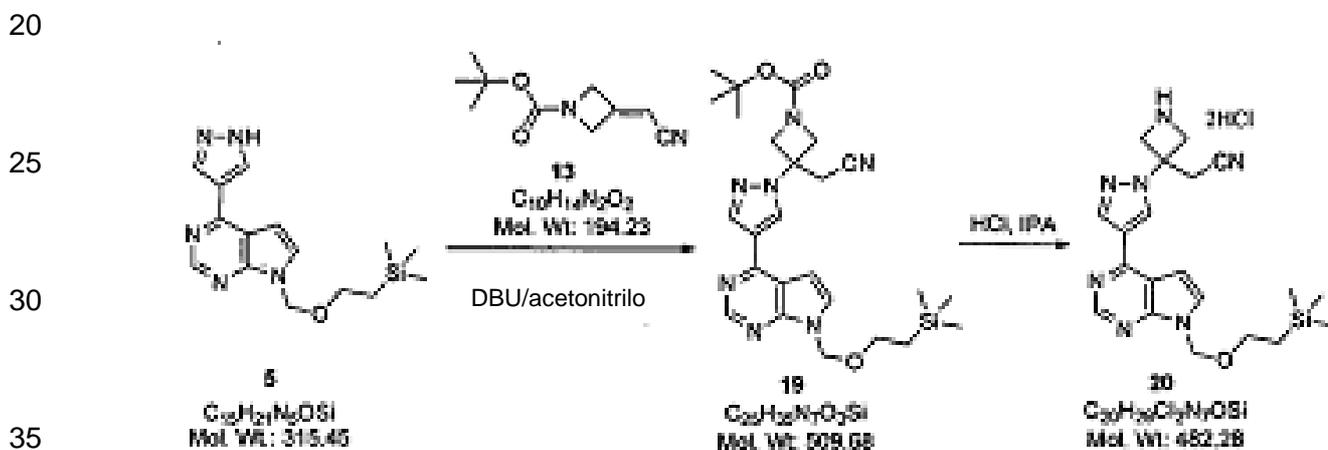
#### Ejemplo 4. (3-Fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**18**)



En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 5 l equipado con un agitador mecánico, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se colocó (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**17**, 100 g, 0.299 mol) en acetonitrilo (ACN, 400 mL) a la temperatura del cuarto. La solución resultante fue enfriada por debajo de los 10 °C. A la mezcla de la reacción se le agregó 6.0 N de ácido hidroclicórico acuoso (HCl, 450 mL, 2.70 mol, equivalente a 9.0), mientras se mantuvo la temperatura interna por debajo de los 10 °C. La mezcla resultante de la reacción fue calentada entonces a la temperatura del cuarto y un monto adicional de 6.0 N de ácido hidroclicórico acuoso (HCl, 1050 mL, 6.30 mol, equivalente a 21.0) fue introducido lentamente a la mezcla de la reacción a la temperatura del cuarto durante 8 horas por medio de un embudo de adición. La mezcla de la reacción fue enfriada entonces a 0 °C antes de ser tratada con un 30% de hidróxido de sodio acuoso (NaOH, 860 mL, 8.57 mmol, equivalente a 28.6) mientras que la temperatura interna se mantuvo por debajo de los 10 °C. La mezcla resultante de la reacción fue calentada subsiguientemente a la temperatura del cuarto antes de la adición de bicarbonato de sodio sólido (NaHCO<sub>3</sub>, 85.0 g, 1.01 mol, equivalente a 3.37) durante una hora. La mezcla fue extraída entonces con EtOAc (2 x 1.2 L), y la fase orgánica combinada fue enjuagada con un 16% de una solución de cloruro de sodio acuoso (2 x 800 mL) y concentrada a aproximadamente 1.0 litros por destilación al vacío. Se agregó heptano (2.1 l) al residuo, y la mezcla resultante fue concentrada a 1.0 litros por destilación al vacío. A la mezcla concentrada se agregó heptano (2.1 l). El lodo blanco resultante fue concentrado entonces a 1.0 litros por destilación al vacío. Al lodo blanco se le agregó entonces éter terc-butílico de metilo (MTBE - methyl *tert*-butyl ether,

1.94 L). La turbidez blanca fue calentada a 40 °C para obtener una solución transparente. La solución resultante fue concentrada a alrededor de 1.0 litros por destilación al vacío. La mezcla fue agitada a la temperatura del cuarto durante una hora. La precipitación blanca fue recolectada por filtraciones con succión al vacío. La torta de filtración fue enjuagada con heptano (400 ml) y secada en el filtro con una exposición a nitrógeno con succión al vacío para suministrar el compuesto 18 (78.3 g, 90.1%) en forma de un sólido blanquecino. Para 18: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.69 Hz, 1 H, NCH en piridina), 7.97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.69 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4.69 Hz, 1 H, NCCH en piridina), 3.92 (br s, 2 H, una de NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, una de otro NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, ambas en una posición axial), 3.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.15 Hz, 2 H, uno de NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, uno de otro NCH<sub>2</sub> en un anillo de piperidina, ambos en una posición ecuatorial), 2.48 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.44 Hz, 2 H, NCCH<sub>2</sub>), 2.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.15 Hz, 2 H, NCCH<sub>2</sub>) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266.89 Hz, C-F), 146.90 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 6.05 Hz, NCH en piridina), 135.56 (C-C=O), 134.78 -135.56 (m, NCCF<sub>3</sub>), 128.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 7.19 Hz, NCCH en piridina), 119.52 (d x cuarteto, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274.38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4.89 Hz, CF<sub>3</sub>), 45.10 (NC en un anillo de piperidina) ppm, un carbono (NCC en un anillo de piperidina) que falta debido a una superposición con (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ -64.58 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15.85 Hz, F3C), -128.90 (d x cuarteto, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15.85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.05 Hz, FC) ppm; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 290.21), LCMS (EI) *m/e* 291.1 (M<sup>+</sup> + H).

**Ejemplo 5. Dihidrocloruro de 3-[4-(7-[[2-(trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]acetidin-3-il]acetitrilo (20)**



**Paso 1. 3-(cianometil)-3-(4-(7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)acetidin-1-carboxilato de terc-butilo (19)**

40

45

50

55

60

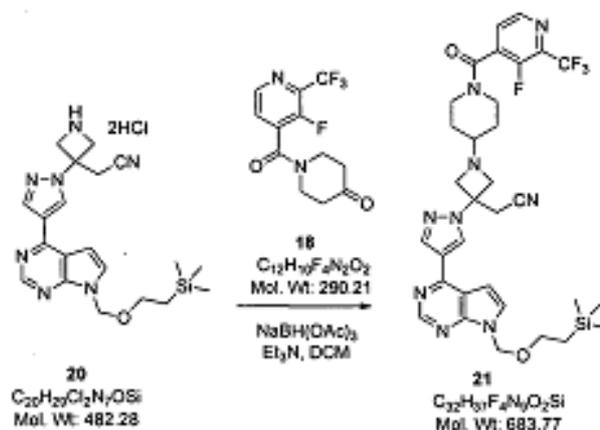
En un reactor seco de 30 l equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un embudo de adición y una salida al vacío se colocó 4-(1H-pirazol-4-il)-7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (5, 4.50 kg, 14.28 mol), 3-(cianometileno)acetidin-1-carboxilato de terc-butilo (13, 3.12 kg, 16.08 mol, equivalente a 1.126) in acetonitrilo (9 L) a 20 ± 5 °C. A la suspensión rosada resultante se le agregó 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU, 225 mL, 1.48 mol, equivalente a 0.10) durante 40 minutos. La temperatura del lote se mantuvo entre 10 °C y 20 °C durante la adición. La solución café obtenida fue agitada a 20 °C durante 3 horas. Después de que se completó la reacción, se agregó agua (18 l) agitándose durante 80 minutos a 20° C. La mezcla fue sembrada y la mezcla sembrada fue agitada a la temperatura del cuarto durante 12 horas. Los sólidos fueron recolectados por medio de filtraciones y la torta de filtración fue lavada con una mezcla de acetonitrilo y agua (1 : 2, 9 L) y secada en un horno al vacío, con una purga de nitrógeno durante 12 horas para suministrar el producto crudo (19, 7.34 kg) en forma de un polvo amarillo claro. El producto crudo obtenido fue disuelto en éter terc-butílico de metilo (MTBE - methyl *tert*-butyl ether, 22 L) a 60 °C en un reactor de 50 l equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un embudo de adición y un septum. Se agregaron hexanos (22 l) durante una hora a 60 °C. La solución fue sembrada, enfriada a 20 °C durante 3 horas y agitada a 20 °C durante 12 horas. La precipitación fue recolectada por medio de filtración. La torta resultante fue enjuagada con una mezcla de MTBE y hexano (1 : 15, 3 L) y secada en un horno al vacío durante 10 horas a 50 °C para suministrar al compuesto 19 (6.83 kg, 13.42 mol, 94.0%) en forma de un polvo blanco. Para 19: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.87 (s, 1 H), 8.46 (d, *J* = 0.6 Hz, 1 H), 8.36 (d, *J* = 0.7 Hz, 1 H), 7.44 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.57 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 4.32 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 3.59 - 3.49 (m, 2H), 3.35 (s, 2H), 1.49 (s, 9H), 0.96 - 0.87 (m, 2H), -0.03 --0.10 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.22, 153.67, 153.24, 151.62, 142.13, 130.16, 129.67, 124.47, 116.72, 115.79, 102.12, 82.54, 74.23, 68.01, 60.25, 58.23, 29.65, 29.52, 19.15, -0.26 ppm; C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>Si (MW, 509.68), LCMS (EI) *m/e* 510.1 (M<sup>+</sup> + H).

**Paso 2. Dihidrocloruro de 3-[4-(7-[[2-(Trimetilsilil)etoxi]metil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]acetidin-3-il]acetitrilo (20)**

65

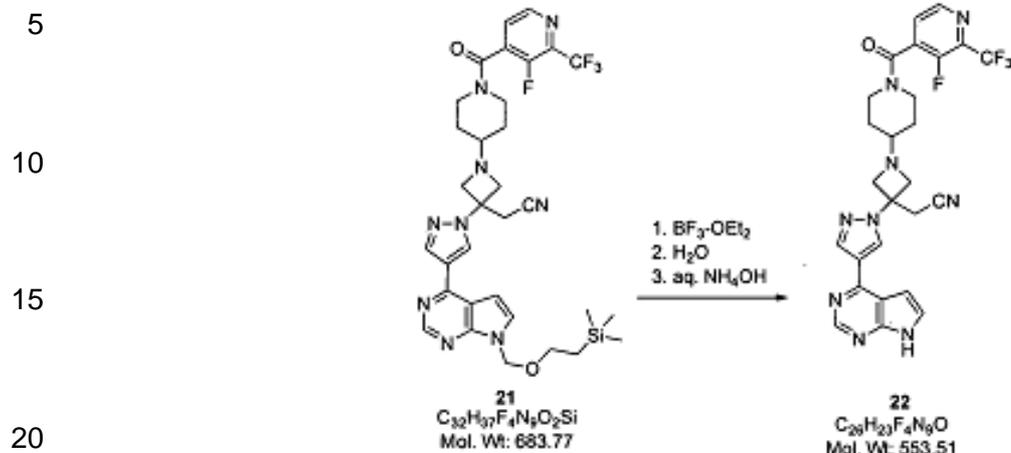
En un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de los libros equipado con un agitador mecánico, un acoplador térmico, un embudo de adición y una entrada en nitrógeno se agregó el compuesto 19 (55.0 g, 0.108 mol) y metanol (MeOH, 440 mL) a  $20 \pm 5$  °C. El turbio blanco fue agitado durante 20 minutos a la temperatura del cuarto para suministrar una solución amarilla clara. Una solución de ácido hidrocórico (HCl) en isopropanol (5.25 M, 165 mL, 0.866 mol, equivalente a 8.02) fue agregada entonces a la mezcla de la reacción por medio de un túnel de adición durante 5 minutos. La mezcla resultante de la reacción fue calentada entonces a 40 °C por medio de una manta calentadora. Después de 2 horas a 40 °C, se agregó agua (165 mL, 9.17 mol, equivalente a 84.8) a la mezcla de la reacción por medio de un embudo de adición para suministrar una solución verde clara a 40 °C. Se agregó éter terc-butílico de metil (MTBE - methyl *tert*-butyl ether, 440 mL) a la mezcla resultante por medio del embudo de adición a 40 °C. La mezcla resultante fue enfriada lentamente a 10 °C. Los sólidos fueron recolectados por medio de filtraciones y lavados con MTBE (2 x 220 mL). Los sólidos blancos fueron secados en el filtro bajo nitrógeno con una succión al vacío durante 18 horas para generar al compuesto 20 (52.2 g, contenido del agua de KF = 5.42%, 94.9% de generación). Para 20:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  10.39 (brs, 1H), 10.16 (brs, 1H), 9.61 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.27 - 8.21 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 7.72 - 7.66 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 5.82 (s, 2H), 4.88 - 4.77 (m, 2H), 4.53 - 4.44 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.69 - 3.60 (m, 2H), 0.98 - 0.89 (m, 2H), 0.01 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  151.25, 146.45, 145.09, 140.75, 133.38, 132.44, 116.20, 116.09, 112.79, 102.88, 73.07, 66.14, 59.16, 53.69, 26.44, 17.15, -1.36 ppm;  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{OSi}$  (una base libre de 20,  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{OSi}$ , MW 409.56), LCMS (EI) *m/e* 410.2 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

**Ejemplo 6. 2-(1-(1-(3-Fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinilo)piperidin-4-il)-3-(4-(7-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)acetidin-3-il)acetoneitrilo (21)**



En un reactor seco de 100 l equipado con un agitador mecánico, un termopar, un condensador y una entrada de nitrógeno se agregó (20, 3.24 kg, 6.715 mol) en diclorometano (32 l) a  $20 \pm 5$  °C. La mezcla fue agitada a la temperatura del cuarto durante 10 minutos antes de ser tratada con trietilamina (TEA, 1.36 kg, 13.44 mol, equivalente a 2.00) a una tasa de adición que mantenga la temperatura interna a 15-30° C. Luego se agregó el compuesto 18 (2.01 kg, 6.926 mol, equivalente a 1.03) al reactor a la temperatura del cuarto. Después de 10 minutos, se agregó en forma de porciones triacetoxiborohidruro de sodio ( $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , 2.28 kg, 10.75 mol, equivalente a 1.60) al reactor durante una hora mientras que la temperatura interna se mantuvo a 15-30° C. La mezcla resultante de la reacción fue agitada a 15-30 °C durante una hora adicional. Una vez que la reacción reductora de aminación fue estimada como completa, la mezcla de la reacción fue tratada con un 4% de solución acuosa de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , 32 L) para ajustar el pH a 7-8. Después de agitarse durante 30 minutos a la temperatura del cuarto, las 2 fases fueron separadas. La fase acuosa fue extraída con diclorometano (29 l). La fase orgánica combinada fue lavada secuencialmente con 0.1 N de una solución acuosa de ácido hidrocórico (16 l), un 4% de solución acuosa de bicarbonato de sodio (16 l), un 8% de una solución acuosa de cloruro de sodio (2 x 16 L). La fase orgánica resultante fue concentrada parcialmente y filtrada. La filtración fue sujeta a intercambio de solventes al agregar gradualmente acetoneitrilo (65 l) al vacío. Los sólidos blancos fueron recolectados por medio de filtraciones, lavados con acetoneitrilo (10 litros) y secados a 40-50 °C en un horno al vacío con una purga de nitrógeno para generar al compuesto 21 (4.26 kg, 6.23 mol, 92.9%). Para 21:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8.84 (s, 1 H), 8.76 (s, 1H), 8.66 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1 H), 8.43 (s, 1H), 7.90 (t,  $J = 4.7$  Hz, 1 H), 7.78 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1 H), 7.17 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.07 (dt,  $J = 11.1, 4.9$  Hz, 1 H), 3.75 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.57 (dd,  $J = 10.2, 7.8$  Hz, 2H), 3.55 (s, 2h), 3.52 (dd,  $J = 8.5, 7.4$  Hz, 2H), 3.41 (dq,  $J = 13.3, 4.3$  Hz, 1H), 3.26 (t,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 3.07 (ddd,  $J = 13.1, 9.4, 3.2$  Hz, 1H), 2.56 (dt,  $J = 8.5, 4.7$  Hz, 1H), 1.81 - 1.73 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.21 (m, 1H), 0.82 (dd,  $J = 8.5, 7.4$  Hz, 2H), -0.12 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  161.68, (154.91, 152.27), 153.08, 152.69, 151.53, 147.69, 140.96, (136.19, 136.02), (136.48, 136.36, 136.13, 136.0, 135.78, 135.66, 135.43, 135.32), 131.43, 130.84, 129.03, (126.17, 123.42, 120.69), 117.99, 122.77, 118.78, 114.71, 102.02, 73.73, 67.04, 62.86, 61.88, 58.51, 45.63, 30.03, 29.30, 28.60, 18.52, 0.00 ppm;  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_2\text{Si}$  (MW, 683.77), LCMS (EI) *m/e* 684.2 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

Ejemplo 7. 2-(3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)acetidin-3-il)acetonitrilo (22)

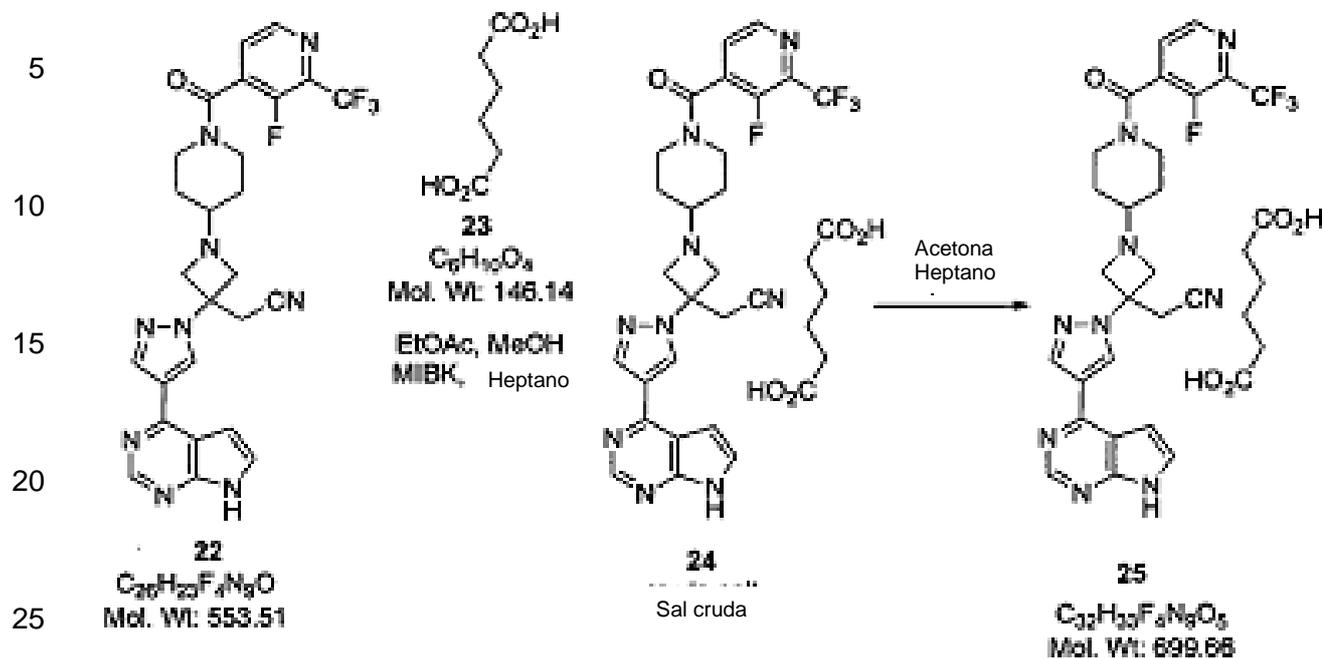


A un matraz de fondo redondo de 4 cuellos de 250 ml equipado con un agitador mecánico, un acoplador térmico, un embudo de adhesión y una entrada de nitrógeno se le agregó el compuesto 21 (9.25 g, 13.52 mmol, contenido de agua de KF = 3.50%) y acetonitrilo (74 ml) a 20 ± 5 °C. El lodo blanco resultante fue enfriado por debajo de los 5 °C. Se agregó entonces eterato dietílico de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, 6.46 mL, 51.37 mmol, equivalente a 3.80) a una tasa mientras se mantuvo la temperatura interna por debajo de los 5 °C. La mezcla de la reacción fue calentada entonces a 20 ± 5 °C. Después de agitarse a 20 ± 5 °C durante 18 horas, la mezcla de la reacción fue enfriada a 0-5 °C y un monto adicional de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (0.34 mL, 2.70 mmol, equivalente a 0.2) fue introducido a la mezcla de la reacción por debajo de 5 °C. La mezcla resultante de la reacción fue calentada a 20 ± 5 °C, y se mantuvo agitándose a la temperatura del cuarto por 5 horas adicionales. La mezcla de la reacción fue enfriada entonces a 0-5 °C antes de que se agregue agua (12.17 mL, 0.676 mol, equivalente a 50). La temperatura interna fue mantenida por debajo de los 5.0 °C durante la adición del agua. La mezcla resultante fue calentada a 20 ± 5 °C y se mantuvo agitándose a la temperatura del cuarto durante 2 horas. La mezcla de la reacción fue enfriada entonces a 0-5 °C y se agregó hidróxido de amonio acuoso (NH<sub>4</sub>OH, 5 N, 121.7 mmol, equivalente a 9.0). Durante la adición de la solución acuosa de hidróxido de amonio, la temperatura interna se mantuvo por debajo de los 5.0 °C. La mezcla resultante de la reacción fue calentada a 20 ± 5 °C y se agitó a la temperatura del cuarto durante 20 horas. Una vez que se estimó que la desprotección de SEM estuvo completa, la mezcla de la reacción fue filtrada, y los sólidos fueron lavados con EtOAc (9.25 mL). Las filtraciones fueron combinadas y diluidas con EtOAc (74 mL). La solución orgánica diluida fue lavada con un 13% de solución acuosa de cloruro de sodio (46.2 mililitros). La fase orgánica fue diluida entonces en EtOAc (55.5 mL) antes de concentrarse a un volumen mínimo bajo presión reducida. Se agregó EtOAc (120 mL) al residuo, y la solución resultante fue agitada a 20 ± 5 °C durante 30 minutos. La solución fue lavada entonces con un 7% de solución acuosa de bicarbonato de sodio (2 x 46 mL) y un 13% de solución acuosa de bicarbonato de sodio (46 ml). La fase orgánica resultante fue diluida con EtOAc (46 mL) y tratada con agua (64 ml) a 50 ± 5 °C durante 30 minutos. La mezcla fue enfriada a 20 ± 5 °C y las 2 fases fueron separadas. La fase orgánica fue tratada con agua (64 ml) a 50 ± 5 °C durante 30 minutos por una 2ª vez. La mezcla fue enfriada a 20 ± 5 °C y las 2 fases fueron separadas. La fase orgánica resultante fue concentrada para generar al compuesto crudo 22 (una base libre), el cual fue purificado más por medio de cromatografía de columnas (SiO<sub>2</sub>, 330 g, elución gradiente con un 0 - 10% de MeOH en EtOAc) para generar una base libre analíticamente pura (22, 7.00 g, 93.5 %) en forma de un sólido blanquecino. Para 22: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□12.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.70 (m, 2H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.78 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.61 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.28 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 3.09 (ddd, J = 13.2, 9.5, 3.1 Hz, 1H), 2.58 (m, 1H), 1.83 - 1.75 (m, 1H), 1.70 - 1.63 (m, 1H), 1.35 - 1.21 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□160.28, (153.51, 150.86), 152.20, 150.94, 149.62, (146.30, 146.25), 139.48, (134.78, 134.61), (135.04, 134.92, 134.72, 134.60, 134.38, 134.26, 134.03, 133.92), 129.22, 127.62, 126.84, 121.99, 122.04, (124.77, 122.02, 119.19, 116.52), 117.39, 113.00, 99.99, 61.47, 60.49, 57.05, 44.23, 28.62, 27.88, 27.19 ppm; C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O (MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.1 (M<sup>+</sup> + H).

Ejemplo 8. Adipato de 2-(3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)acetidin-3-il)acetonitrilo (25)

60

65



30 *Paso 1. Sal cruda de adipato de 2-(3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)acetidin-3-il)acetonitrilo*

El proceso de realizar el compuesto 22 en el ejemplo 7 fue seguido, excepto que la fase orgánica final fue concentrada por destilación al vacío al volumen mínimo para generar el compuesto crudo 22 el cual no fue aislado pero fue usado directamente en el proceso de formación subsiguiente de la sal de adipato. Al residuo concentrado que contenía al compuesto crudo 22 se le agregó metanol (200 ml) a la temperatura del cuarto. La mezcla fue concentrada entonces por medio de destilación al vacío a un volumen mínimo. Al residuo se le agregó metanol (75 ml) y la solución resultante fue calentada para hacer reflujos durante 2 horas. Se agregó cetona isobutílica de metilo (MIBK - Methyl isobutyl ketone, 75 mL) a la solución y la mezcla resultante fue destilada al vacío a alrededor de 30 ml mientras que la temperatura interna se mantuvo a 40-50 °C. Se agregó metanol (75 ml) y la mezcla resultante fue calentada haciendo reflujos durante 2 horas. A la solución se agregó MIBK (75 mL). La mezcla fue destilada nuevamente al vacío a alrededor de 30 ml mientras que la temperatura interna se mantuvo a 40-50 °C. A la solución se le agregó una solución de ácido adipático (**23**, 2.15 g, 14.77 mmol) en metanol (75 ml) la solución resultante fue calentada entonces para hacer reflujos durante 2 horas. Se agregó MIBK (75 mL). La mezcla fue destilada al vacío a alrededor de 60 ml mientras que la temperatura interna se mantuvo a 40-50 °C. La calefacción se paró y se agregó heptano (52.5 mililitros) durante 1-2 horas. La mezcla resultante fue agitada a 20 ± 5 °C durante 3-4 horas. Las precipitaciones blancas fueron recolectadas por medio de filtraciones, y la torta de filtración fue lavada con heptano (2 x 15 mL). El sonido fue secado en el filtro bajo nitrógeno con una succión al vacío a 20 ± 5 °C durante 12 horas para suministrar el compuesto 24 (una sal de adipato cruda, 8.98 g, 12.84 mmol., 95.0%). Para 24: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□12.16 (s, 1H), 12.05 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.69 (d, J= 4.7 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, J= 4.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J= 3.6, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, J= 3.6, 1.7 Hz, 1H), □□□4.11 (dt, J= 11.0, 4.4 Hz, 1H), 3.77 (d, J= 7.8 Hz, 2H), 3.60 (t, J= 7.8 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.44 (dt, J= 14.4, 4.6 Hz, 1H), 3.28 (t, J= 10.4 Hz, 1H), 3.09 (ddd, J= 13.2, 9.6, 3.2 Hz, 1H), 2.58 (tt, J= 8.6, 3.5 Hz, 1H), 2.28 - 2.17 (m, 4H), 1.83 - 1.74 (m, 1H), 1.67 (d, J= 11.0 Hz, 1H), 1.59 - 1.46 (m, 4H), 1.37 - 1.21 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□174.38, 160.29, (153.52, 150.87), 152.20, 150.94, 149.63, (146.30, 146.25), 139.48, (134.79, 134.62), (135.08, 134.97, 134.74, 134.62, 134.38, 134.28, 134.04, 133.93), 129.21, 127.62, 126.84, 122.05, (124.75, 122.02, 119.29, 116.54), 117.39, 113.01, 99.99, 61.47, 60.50, 57.06, 44.24, 33.42, 30.70, 28.63, 27.89, 27.20, 24.07 ppm; C<sub>32</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> (Masa Molecular: 699.66; **24**: C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O, MW 553.51), LCMS (EI) *m/e* 554.0 (M<sup>+</sup> + H).

60 *Paso 2. Adipato de 2-(3-(4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetonitrilo (25)*

En un reactor seco de 100 l equipado con un agitador mecánico, un termopar, un embudo de adición y una entrada en nitrógeno se le agregó el compuesto 24 (3.40 kg, 4.86 mol) y acetona (23.8 litros). El turbio blanco resultante fue calentado a 55-60 °C para suministrar una solución transparente. La solución resultante fue filtrada a través de un filtro en línea a otro reactor de 100 l. Se filtró heptano (23.8 litros) a través de un filtro en línea a un reactor separado

de 50 l. El heptano filtrado fue cargado entonces a la solución de acetona en el reactor de 100 l a una tasa con la cual la temperatura interna se mantuvo a 55-60 °C. La mezcla de la reacción en el reactor de 100 l fue enfriada entonces a 20 ± 5 °C y agitada a 20 ± 5 °C durante 16 horas. Las precipitaciones blancas fueron recolectadas por medio de filtraciones y la torta fue lavada con heptano (2 x 5.1 L) y secada en el filtro bajo nitrógeno con una aspiradora de succión. El sólido fue secado aún más en un horno al vacío a 55-65 °C con una purga de nitrógeno para suministrar el compuesto 25 (3.11 kg, 92.2%) en forma de un polvo blanquecino. Para 25: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□12.16 (s, 1H), 12.05 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.69 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 3.6, 1.7 Hz, 1H), □□4.11 (dt, *J* = 11.0, 4.4 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.44 (dt, *J* = 14.4, 4.6 Hz, 1H), 3.28 (t, *J* = 10.4 Hz, 1H), 3.09 (ddd, *J* = 13.2, 9.6, 3.2 Hz, 1H), 2.58 (tt, *J* = 8.6, 3.5 Hz, 1H), 2.28 - 2.17 (m, 4H), 1.83 - 1.74 (m, 1H), 1.67 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 1.59 - 1.46 (m, 4H), 1.37 - 1.21 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) □□□174.38, 160.29, (153.52, 150.87), 152.20, 150.94, 149.63, (146.30, 146.25), 139.48, (134.79, 134.62), (135.08, 134.97, 134.74, 134.62, 134.38, 134.28, 134.04, 133.93), 129.21, 127.62, 126.84, 122.05, (124.75, 122.02, 119.29, 116.54), 117.39, 113.01, 99.99, 61.47, 60.50, 57.06, 44.24, 33.42, 30.70, 28.63, 27.89, 27.20, 24.07 ppm; C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> (Masa Molecular: 699.66; base libre: C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O (MW, 553.51), LCMS (EI) *m/e* 554.0 (M<sup>+</sup> + H).

#### Ejemplo A: ensayo in vitro de las quinasas JAK

El compuesto de la Fórmula I aquí descrito fue probado para detectar su actividad inhibitoria de los objetivos JAK de acuerdo al siguiente ensayo in vitro descrito en Park et al., *Analytical Biochemistry* (Bioquímica Analítica) 1999, 269, 94-104. Los dominios catalíticos de JAK1 (a.a. 837-1142) y JAK2 (a.a. 828-1132) humanos con una marcación His de la terminal N fueron expresados utilizando un baculovirus en células de insectos y purificadas. La actividad catalítica de JAK1 y JAK2 fueron expuestas a ensayos para medir la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado fue detectado por fluorescencia homogénea resuelta por tiempo (HTRF - homogenous time resolved fluorescence). Los IC<sub>50</sub>s de los compuestos fueron medidos para cada quinasas en las reacciones de 40 μl que contenían a la enzima, a ATP y a 500 nM de péptidos en un amortiguador de 50mM (pH 7.8) con 100 mM de NaCl, 5 mM de DTT, y 0.1 mg/mL (0.01%) de BSA. Para las medidas de 1 mM de IC<sub>50</sub>, la concentración ATP en las reacciones fue de 1mM. Las reacciones fueron ejecutadas a la temperatura del cuarto durante una hora y luego pararon con 20 μl de 45 mM de EDTA, 300 nM de SA-APC, 6 nM de Eu-Py20 en un amortiguador para ensayos (Perkin Elmer, Boston, MA). Los enlaces al anticuerpo marcado como europio ocurrieron durante 40 minutos y la señal HTRF se midió en un lector de platos Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). El compuesto del ejemplo 1 y la sal del ácido adípico tuvieron un IC<sub>50</sub> en JAK1 menor o igual a 5 nM (medido en 1mM de ATP) con una tasa JAK2/JAK1 mayor a 10 (medida en 1mM de ATP).

#### Ejemplo B: ensayos celulares

Las líneas de células cancerígenas dependen de citoquinas y por lo tanto la transducción de señales de JAK/STAT, para crecimiento, puede ser puestas en platos a 6000 células por pozo (un formato de platos de 96 pozos) en RPMI 1640, 10% de FBS, y 1 nG/mL de una citoquinas apropiada. Los compuestos pueden ser agregados a las células en un DMSO/medio (una concentración final de 0.2 por ciento de DMSO) incubadas durante 72 horas at 37 °C, con un 5% de CO<sub>2</sub>. El efecto del compuesto en la viabilidad celular es evaluado utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente de CellTiter-Glo (Promega) seguido por una cuantificación de TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Efectos colaterales potenciales de los compuestos son medidos en paralelo utilizando una línea celular que no es controlada por JAKs con la misma lectura del ensayo. Todos los experimentos son realizados comúnmente por duplicado.

Las líneas celulares que se acaban de mencionar también pueden ser utilizadas para examinar los efectos de los compuestos en la fosforilación de quinasas JAK o de los sustratos potenciales más adelante en el proceso tales como las proteínas STAT, Akt, Shp2, o Erk. Estos experimentos pueden ser realizados siguiendo una privación de citoquinas durante la noche, seguida por una pre-incubación breve con el compuesto (2 horas o menos) y la estimulación de citoquinas de aproximadamente una hora o menos. Las proteínas son extraídas entonces de las células y analizadas por medio de técnicas que son familiares para aquellas personas con conocimiento en la industria incluyendo a Western blotts o ELISAs usando anticuerpos que pueden diferenciar entre proteínas fosforiladas y totales. Estos experimentos pueden utilizar células normales o cancerígenas al investigar la actividad de los compuestos en la biología de supervivencia de las células tumorales o en intermediadores de las enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, en referencia a los mediadores de enfermedades inflamatorias, citoquinas tales como IL-6, IL-12, IL-23, o IFN pueden utilizarse para estimular la activación de JAKs que resulta en la fosforilación de proteínas STAT y potencialmente en perfiles de transcripción (evaluado por un ensayo o por tecnología qPCR) o la producción y/o secreción de proteínas, tales como la IL-17. La capacidad de los compuestos de inhibir estos efectos regulados por la citoquinas puede medirse utilizando técnicas comunes para aquellas personas con conocimiento en la industria.

Los compuestos aquí indicados también pueden ser probados en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad en contra de JAKs mutantes, por ejemplo, la mutación JAK2V617F encontrada en las enfermedades proliferativa de mieloides. Estos experimentos a menudo utilizan células que dependen de citoquinas

de linaje hematológico (e.g. BaF/3) en las cuales quinasas de tipo silvestre o mutantes de JAK son expresadas ectópicamente (James, C., et al. *Nature* (naturaleza) 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC* 280:41893-41899). Los puntos finales incluyen los efectos de los compuestos en la supervivencia celular, la proliferación y las proteínas fosforiladas de JAK, STAT, Akt o Erk.

5  
 10  
 15  
 20  
 Ciertos compuestos aquí descritos pueden ser evaluados por su actividad para inhibir la proliferación de células T. Un ensayo como estos puede ser considerado un 2º ensayo de proliferación controlada por citoquinas (es decir, JAKs) y también un ensayo simple de la supresión inmunológica o la inhibición de la activación inmunológica. A continuación se presenta un resumen breve de como aquellos experimentos pueden ser realizados. Las células periféricas mononucleares sanguíneas (PBMCs – Peripheral blood mononuclear cells) son preparadas de muestras sanguíneas completas humanas utilizando el método de separación de Ficoll Hypaque y las células T (fracción 2000) pueden ser obtenidas de las PBMCs por medio de un elutriador. Células T aislados recientemente pueden ser mantenidas en un medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 U/mililitros de penicilina, 100 µg/mililitros de estreptomocina (a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mililitro a 37 °C durante 2 días. Para el análisis de proliferación celular estimulado por IL-2, las células T son tratadas primero con fitohemaglutinina (PHA - Phytohemagglutinin) a una concentración final de 10 µg/mililitros durante 72 horas. Después de lavarse una vez con PBS, son colocadas en platos a 6000 células/pozo en platos de 96 pozos y tratadas con compuestos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo en la presencia de 100 U/mililitros de IL-2 (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Los platos son incubados a 37 °C durante 72 horas y el índice de proliferación es evaluado utilizando reactivos luminiscentes de CellTiter-Glo siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Promega; Madison, WI).

#### **Ejemplos C: eficacia anti tumores in- vivo**

25  
 30  
 35  
 Los compuestos aquí descritos pueden ser evaluados en modelos de xenoinjertos tumorales humanos en ratones con un sistema inmunológico comprometido. Por ejemplo, una variante de carcinogénesis de la línea celular de plasmacitomas INA-6 puede ser utilizada para inocular subcutáneamente a los ratones (Burger, R., et al. *Hematol J.* 2:42-53, 2001). Los animales que tienen los tumores pueden ser colocados aleatoriamente en grupos de tratamiento con medicamentos o con portadores y se les puede administrar diferentes dosis de los compuestos por cualquier número de rutas usuales incluyendo la vía oral, i.p., o infusiones continuas utilizando bombas implantables. El crecimiento tumoral es observado durante el tiempo utilizando calibradores. Además, las muestras de tumores pueden ser cultivadas en cualquier momento después de la iniciación del tratamiento para su análisis tal como se describió anteriormente (ejemplo B) para evaluar los efectos del compuesto en la actividad de JAKs y los senderos de señalización más adelante en el proceso. Adicionalmente, la selectividad de los compuestos puede ser evaluada utilizando modelos tumorales de xenoinjertos que son controlados por otras quinasas conocidas (por ejemplo, Bcr-Abl) tal como el modelo tumor de K562.

#### **Ejemplo D: la prueba de respuesta de hipersensibilidad retrasada por contacto térmico en ratones**

40  
 45  
 Los compuestos aquí indicados también puede ser probados para detectar sus eficacia es (para inhibir los objetivos JAK) en el modelo de prueba de hipersensibilidad retrasada en ratones controlada por las células T. La respuesta de hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH - delayed-type hypersensitivity) por contacto térmico en ratones es considerado un modelo válido de dermatitis por contacto clínico, y otras enfermedades inmunológicas controladas por los linfocitos T de la piel, tales como psoriasis (*Immunol Today* (Hoy). 1998 en el;19(1):37-44). El DTH en ratones comparte varias características con la psoriasis, incluyendo la infiltración inmunológica, el incremento acompañante de citoquinas inflamatorias y la hiper - proliferación de queratinocitos. Además, muchos tipos de agentes que son eficaces en el tratamiento de psoriasis en la clínica son también inhibidores efectivos de la respuesta DTH en ratones (*Agents Actions* (Agentes Acciones). Enero 1993;38(1-2):116-21).

50  
 55  
 60  
 En el día 0 y 1, ratones Balb/c son sensibilizados con una aplicación tópica, a su abdomen afeitado con antígeno 2,4,dinitro-fluorobenceno (DNFB). En el día 5, los oídos son medidos para definir su grosor utilizando un micrómetro de ingeniería. Esta medida es registrada y utilizada como una línea base. Se aplica tópicamente a ambas orejas del animal DNFB con un total de 20 µl (10 µm en el pabellón auricular interno y 10 µl en el pabellón auricular externo) a una concentración de 0.2 por ciento. Después de 24 a 72 horas de la aplicación, las orejas son medidas nuevamente. El tratamiento con los compuestos de prueba es dado a través de las bases de sensibilización y de aplicación (desde el día -1 al día 7) o antes y a través de la fase de aplicación (usualmente en la tarde del día 4 al día 7). El tratamiento de los compuestos de prueba (en diferentes concentraciones) es administrada sistémicamente o tópicamente (aplicación tópica del tratamiento de las orejas). Las eficacias de los compuestos de prueba son indicadas por una reducción de la hinchazón de la oreja en comparación a la situación sin tratamiento. Los compuestos que causen una reducción del 20% o más fueron considerados eficaces. En algunos experimentos, los ratones experimentan la aplicación pero no son sensibilizados (control negativo).

65  
 El efecto inhibitor (que inhibe la activación de los senderos JAK-STAT) de los compuestos de prueba pueden confirmarse por medio de un análisis inmunohistoquímico. La activación de los senderos JAK-STAT resulta en la formación y translocación de factores de transcripción funcional. Además, la afluencia de células inmunológicas y el incremento en la proliferación de queratinocitos también deberían suministrar cambios únicos en el perfil de

expresiones en la oreja que pueden investigarse y cuantificarse. Secciones de las orejas fijadas con formalina y adheridas con parafina (cultivadas después de la fase de aplicación en el modelo DTH) son sujetas a análisis inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo que interactúa específicamente con STAT3 fosforilado (clon 58E12, Cell Signaling Technologies). Las orejas de los ratones son tratadas con compuestos y portadores de prueba o dexametasona (un tratamiento clínicamente eficaz para la psoriasis), o sin ningún tratamiento, en el modelo DTH para comparaciones. Los compuestos de prueba y la dexametasona pueden producir cambios similares de transcripciones en formas cualitativas y cuantitativas, y los compuestos de prueba y la dexametasona puede reducir el número de células que se infiltran. La administración sistémica y tópica de los compuestos de prueba puede producir efectos inhibidores, es decir, la reducción en el número de células que se infiltran y la inhibición de cambios en transcripciones.

#### **Ejemplo E: actividad antiinflamatoria in vivo**

Los compuestos aquí descritos pueden ser evaluados en modelos de roedores y de no roedores diseñados para replicar una respuesta inflamatoria simple o compleja. Por ejemplo, los modelos de roedores de artritis pueden ser utilizados para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos administrados preventivamente o terapéuticamente. Estos modelos incluyen pero no se limitan a artritis inducida por colágeno a ratones o ratas, artritis inducida por adyuvantes a ratas y artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Enfermedades autoinmunes incluyendo, pero sin limitarse a, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I, uveoretinitis, tiroiditis, miastenia gravis, nefropatías de inmunoglobulinas, miocarditis, sensibilización de las vías respiratorias (asma), lupus o colitis también pueden ser utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos aquí descritos. Estos modelos son bien establecidos en la comunidad de investigación y son familiares para aquellas personas con conocimiento en la industria (Current Protocols in Immunology (Protocolos Actuales en Inmunología), Vol 3., Coligan, J.E. et al, Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225, Inflammation Protocols. (Métodos en Biología Molecular: Volumen 225, Protocolos de Inflamaciones), Winyard, P.G. and Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

#### **Ejemplo F: modelos animales para tratamiento del ojo seco, uveítis y conjuntivitis**

Los agentes pueden ser evaluados en uno o más modelos pre-clínicos de ojo seco conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria incluyendo, pero sin limitarse a, el modelo de glándulas lacrimales de concanavalina A (ConA) de conejo, el modelo de escopolamina en ratones (subcutáneo o transdérmico), el modelo de glándulas lacrimales de ratones botulínicos, o cualquiera de un número de modelos espontáneos autoinmunes de roedores que resultan en la disfunción de la glándula ocular (e.g. NOD-SCID, MRL/lpr, o NZB/NZW) (Barabino et al., Experimental Eye Research (Investigación Ocular Experimental) 2004, 79, 613-621 y Schrader et al., Developmental Ophthalmology (Oftalmología del Desarrollo), Karger 2008, 41, 298-312, cada una de las cuales es incorporada completamente en este documento por referencia). Los puntos finales de estos modelos podrían incluir la histopatología de las glándulas oculares y del ojo (córnea, etcétera) y posiblemente la prueba clásica de Schirmer o sus versiones modificadas (Barabino et al.) las cuales miden la producción de lágrimas. La actividad puede ser evaluada a través de dosis por medio de varias rutas de administración (por ejemplo, sistémicas o tópicas) lo cual podría empezar antes o después de que exista una enfermedad que se pueda medir.

Los agentes pueden ser evaluados en uno o más modelos pre-clínicos de uveítis conocidos para aquellos con conocimiento en la industria. Estos incluyen, pero no se limitan a, modelos de uveítis autoinmune experimental (EAU - experimental autoimmune uveitis) y uveítis inducida por endotoxinas (EIU - endotoxin induced uveitis). Los experimentos con EAU pueden ser realizados en conejos, ratas o ratones y pueden involucrar inmunizaciones de tipo pasivo o activo. Por ejemplo, cualquiera de un número de antígenos retinales podrían ser utilizados para sensibilizar a los animales en relación a un inmunógeno relevante después de lo cual se podría aplicar a los animales, ocularmente, con el mismo antígeno. El modelo EIU es más agudo e involucra la administración local o sistémica de dosis sub letales de lipopolisacáridos. Los puntos finales de los modelos EIU y EAU podrían incluir al examen del fondo del ojo, histopatología, entre otros. Estos modelos son revisados por Smith et al. (Immunology and Cell Biology (Inmunología y Biología Celular) 1998, 76, 497-512, la cual se incorpora completamente en este documento por referencia). La actividad es evaluada al administrar dosis por medio de varias rutas (por ejemplo, sistémicamente o tópicamente) lo cual podría empezar antes o después de que exista una enfermedad que se pueda medir. Algunos modelos que se listaron anteriormente también podrían desarrollar escleritis/epiescleritis, coroiditis, ciclitis o iritis y por lo tanto son útiles en la investigación de la actividad potencial de los compuestos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

Los agentes también pueden ser evaluados en uno o más modelos pre-clínicos de conjuntivitis conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Estas incluyen, pero no se limitan a, modelos de roedores que utilizan a conejillos de indias, ratas o ratones. Los modelos de conejillos de indias incluyen aquellos que utilizan inmunizaciones activas o pasivas y/o protocolos de aplicación inmunológica con antígenos tales como la ovoalbúmina o la ambrosía (revisado en Groneberg, D.A., et al., Allergy (Alergia) 2003, 58, 1101-1113, el cual es incorporado completamente en este documento por referencia). Los modelo de ratas y ratones son similares en diseño general a aquellos de conejillos de indias (también revisados por Groneberg). La actividad podría ser evaluada al administrar dosis por varias rutas (por ejemplo, sistémicamente o tópicamente) lo cual podría empezar antes o después de que exista una enfermedad que se pueda medir. Los puntos finales para aquellas

investigaciones podrían incluir, por ejemplo, análisis histológicos, inmunológicos, bioquímicos o moleculares de tejidos oculares tales como el conjuntivo.

**Ejemplo G: protección ósea in vivo**

5 Los compuestos pueden ser evaluados en varios modelos pre-clínicos de osteopenia, osteoporosis o resorción ósea conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Por ejemplo, roedores a los que se les ha sacado los ovarios pueden ser utilizados para evaluar la capacidad de los compuestos para afectar las señales y marcadores de la remodelación y/o densidad ósea (W.S.S. Jee y W. Yao, J Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 10 1(3), 193-207, el cual es incorporado completamente por referencia a este documento). Alternamente, la densidad y la arquitectura ósea podrían evaluarse en roedores de control o tratados con el compuesto en modelos de osteopenia inducida por terapias (por ejemplo, glucocorticoides) (Yao, et al. Arthritis and Rheumatism (Artritis y Reumatismo), 2008, 58(6), 3485-3497; e ídem 58(11), 1674-1686, las cuales están incorporadas completamente a este documento por referencia). Adicionalmente, los efectos de los compuestos, en lo que se refiere a resorción y 15 densidad ósea, pueden ser evaluables en modelos de roedores de artritis los cuales ya fueron mencionados (ejemplo E). Los puntos finales para todos estos modelos podrían variar pero a menudo incluyen evaluaciones histológicas y radiológicas así como inmunohistología y marcadores bioquímicos adecuados de remodelación ósea.

20

25

30

35

40

45

50

55

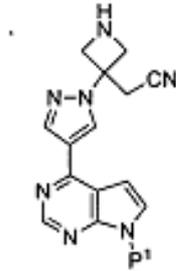
60

65

Reivindicaciones

1. Un proceso, que comprende la reacción de un compuesto de la fórmula III:

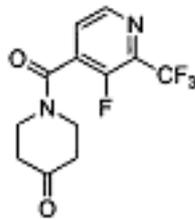
5



III

- o una de sus sales, con un compuesto de la fórmula IV:

20

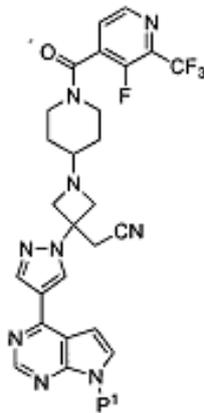


25

IV

- en la presencia de un agente reductor para formar un compuesto de la fórmula II:

35



40

45

50

II

o una de sus sales, siempre y cuando dicho agente reductor no sea cianoborodeuterio de sodio; donde P¹ es un grupo protector.

55

2. El proceso de la reivindicación 1, donde dicho grupo protector es -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.
3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho agente reductor es seleccionado de cianoborohidruro de sodio y triacetoxiborohidruro de sodio.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde los compuestos de la fórmula II, III y IV son cada uno una base libre.

60

65

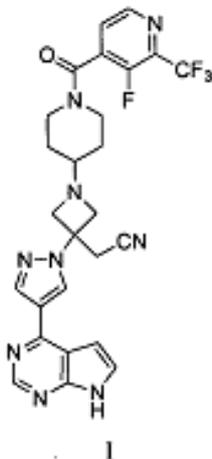
6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que incluye además la desprotección de un compuesto de la fórmula II, o su sal, para formar un compuesto de la fórmula I:

5

10

15

20



o una de sus sales.

25

30

35

40

45

50

55

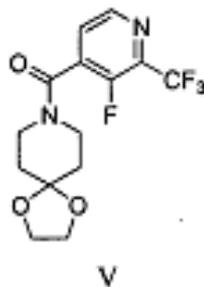
60

65

7. El proceso de la reivindicación 6, donde dicha desprotección comprende el tratamiento con eterato de trifluoruro, seguido de un tratamiento con hidróxido de amonio acuoso.
8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a la 7, donde dicho proceso comprende además la reacción del compuesto de la fórmula I con un ácido adípico para formar la sal de adipato.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a la 8, donde los compuestos de las fórmulas I, II, III y IV son cada uno una base libre.
10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a las 7, donde dicho proceso incluye además:
- calentar el compuesto de la fórmula I en metanol para que haga reflujos para formar una mezcla;
  - después de (a), agregar cetona isobutílica de metilo a la mezcla;
  - después de (b), remover una porción del solvente por medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;
  - después de (c), agregar metanol a la mezcla concentrada para formar una mezcla diluida;
  - después de (d), calentar a la mezcla diluida para que haga reflujos para formar una mezcla;
  - después de (e), agregar cetona isobutílica de metilo a la mezcla;
  - después de (f), remover una porción del solvente del medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;
  - después de (g), agregar ácido adípico y metanol a la mezcla concentrada;
  - después de (h), calentar la mezcla para que haga reflujos; y
  - después de (i), remover una porción del solvente por medio de destilación a una temperatura interna de 40 °C a 50 °C para formar una mezcla concentrada;
  - después de (j), agregar heptano a la mezcla; y
  - después de (k), agitar la mezcla a la temperatura del cuarto para formar la sal de ácido adípico del compuesto de la fórmula I.
11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a la 10, donde el compuesto de la fórmula IV, o una de sus sales, es producida por un proceso que comprende la desprotección de un compuesto de la fórmula V:

5

10



o una de sus sales.

15

12. El proceso de la reivindicación 11, donde dicha desprotección comprende la reacción con un ácido acuoso.

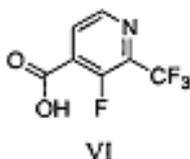
13. El proceso de la reivindicación 12, donde dicho ácido es ácido hidroclicóric.

20

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a la 13, donde los compuestos de las fórmulas I, II, III, IV y V son cada uno una base libre.

25

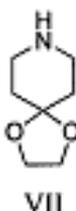
15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a la 14, donde dicho compuesto de la fórmula V, o una de sus sales, es producida mediante un proceso que comprende la reacción de un compuesto de la fórmula VI:



30

con un compuesto de la fórmula VII:

35



40

45

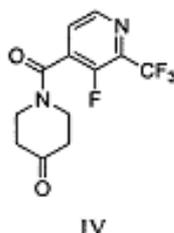
en la presencia de un agente acoplador.

50

16. El proceso de la reivindicación 15, donde el agente acoplador es hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP - benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate).

55

17. Un proceso para elaborar a un compuesto de la fórmula IV:

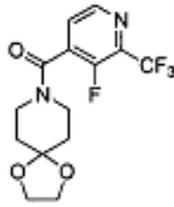


60

o una de sus sales, que comprende la desprotección de un compuesto de la fórmula V:

65

5



10

V

o una de sus sales, para formar un compuesto de la Fórmula IV, o su sal ya mencionada.

15

18. El proceso de la reivindicación 17, donde dicha desprotección comprende la reacción con un ácido acuoso.

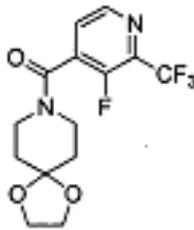
19. El proceso de la reivindicación 18, donde dicho ácido es el ácido hidrocórico.

20

20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, donde los compuestos de la fórmula IV y V son cada uno una base libre.

21. Un proceso para elaborar un compuesto de la fórmula V:

25



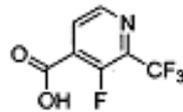
30

V

35

o una de sus sales, que comprende la reacción de un compuesto de la fórmula VI:

40

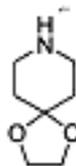


VI

45

o una de sus sales, con un compuesto de la fórmula VII:

50



55

VII

o una de sus sales, en la presencia de un agente de acoplamiento para formar el compuesto de la fórmula V, o a su sal ya mencionada.

60

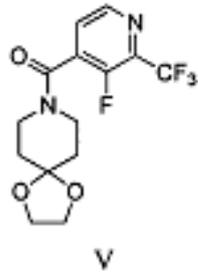
22. El proceso de la reivindicación 21, donde el agente de acoplamiento es hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio (BOP - benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate).

65

23. Un compuesto de la fórmula V:

5

10



15

o su sal.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65