

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 827**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2013 PCT/US2013/044211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2013 E 13729215 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2861231**

54 Título: **Inhibidor de JAK1 y JAK2**

30 Prioridad:

14.06.2012 US 201261659679 P

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

16.03.2017

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BURKHOLDER, TIMOTHY PAUL y
CLAYTON, JOSHUA RYAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 605 827 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de JAK1 y JAK2

La presente invención se refiere al campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto de pirazolamino o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que inhibe JAK1 y JAK2 y puede ser útil para tratar el cáncer.

La familia de las cinasas Janus (JAK) es un grupo de tirosinas cinasas e incluyen JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. La familia JAK transmite señales mediadas por las citocinas en las células mediante las rutas de JAK-STAT (transductor de señales y activador de la transcripción). Un de estas rutas, JAK-STAT3, es constitutivamente activa en muchos tipos de cánceres humanos y líneas celulares de cáncer. Se ha implicado a la STAT3 constitutivamente activa en las células tumorales para incrementar la proliferación, la supervivencia y la progresión.

JAK3 se expresa preferentemente en los linfocitos; se han comunicado efectos inmunosupresores para los inhibidores de JAK3. Dada la actividad inmunosupresora de los inhibidores de JAK3, para su uso en la terapia del cáncer se buscaría inhibición de la JAK1 y JAK2 y selectividad frente a JAK.

El documento WO 2006/087530 divulga ciertos compuestos de pirazol como inhibidores de las tirosina cinasas receptoras y divulga adicionalmente los compuestos como útiles en el tratamiento del cáncer. En el documento WO 2007/140222 se divulgan ciertos compuestos de pirrolpirimidina como inhibidores de la proteína cinasa. En el documento WO 2008/129255 se divulgan ciertos derivados de 5-aminopirazol-3-il-3H-imidazo[4,5-b]piridina y su uso para el tratamiento del cáncer.

Sigue habiendo la necesidad de proporcionar potentes inhibidores de JAK1 alternativos para el tratamiento de tumores sólidos. También sigue habiendo la necesidad de proporcionar potentes inhibidores de JAK que sean selectivos de JAK1 y JAK2 con respecto a JAK3. En consecuencia, la presente invención proporciona potentes inhibidores de la JAK1 y JAK2. Asimismo, la presente invención proporciona potentes inhibidores de JAK que sean selectivos de JAK1 y JAK2 con respecto a JAK3.

La presente invención proporciona un compuesto que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina. Como otra realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende que es dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende además uno o más agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en terapia. La presente invención proporciona 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de cáncer, comprendiendo la composición 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente invención proporciona el uso de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la fabricación de un medicamento. La presente invención proporciona el uso de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina en forma cristalina. La presente invención también proporciona 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-

dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina en forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene picos característicos, en $2\theta \pm 0,2$, que se producen a 16,11 y uno o más de 44,32, 8,71, 13,12, 15,19 y 18,86.

5 Adicionalmente, la presente invención proporciona formas de realización preferidas de los usos como se describe en el presente documento, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma de páncreas, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y cáncer de colon.

Como se ha usado anteriormente y a lo largo de la descripción de la invención, se entenderá que los términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, tienen los significados siguientes:

10 Un "vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable" es un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a mamíferos, por ejemplo, a seres humanos.
 "Sales farmacéuticamente aceptables" hace referencia a las sales relativamente no tóxicas inorgánicas y orgánicas de compuestos de la presente invención.
 15 "Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la cantidad del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la presente invención o una composición farmacéutica que contiene un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o ser humano que está buscando el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

20 Con los términos "tratamiento", "tratar", "que trata" y similares se pretende incluir la ralentización o inversión de la progresión de un trastorno. Estos términos también incluyen aliviar, mejorar, atenuar, eliminar o reducir uno o más síntomas de un trastorno o afección, aunque el trastorno o afección no se elimine realmente y aunque la progresión del trastorno o afección no se ralentice o invierta en sí.

25 Los compuestos de la presente invención son capaces de reaccionar, por ejemplo, con una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y col., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, N.º 1, enero de 1977.

30 Los compuestos de la presente invención se formulan, preferiblemente, como composiciones farmacéuticas usando un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable y se administran por diversas rutas. Preferentemente, dichas composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, y col., eds., 21ª ed., Mack Publishing Co., 2005).

35 La cantidad del compuesto de la presente invención administrada realmente la determinará un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado o los compuestos reales administrados de la presente invención, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente. Las dosificaciones diarias normalmente entran dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 mg. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo mencionado anteriormente pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún mayores. El experto en la técnica puede 40 determinar los niveles de dosificación.

45 Los compuestos de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden preparar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, así como los descritos en los ejemplos siguientes. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes maneras de preparar los compuestos de la invención, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

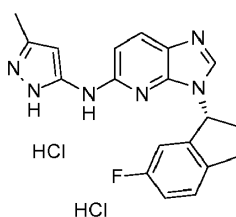
50 Los reactivos y materiales de partida están, generalmente, fácilmente disponibles para un experto versado en la técnica. Otros pueden fabricarse mediante técnicas estándar de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a las síntesis de compuestos activos y profármacos conocidos de estructura similar y los procedimientos descritos en los ejemplos que siguen, incluyendo cualquier procedimiento nuevo. Los compuestos ilustrados en el presente documento se citan y numeran usando ACDLABS o Sympyx Draw 3.2.

55 El compuesto del ejemplo 1 se denomina: dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina; y también se puede denominar 3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-, dihidrocloruro; y se pueden usar otros nombres para identificar sin ambigüedad el compuesto del ejemplo 1. El compuesto del ejemplo 2 se denomina: 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina y también puede denominarse: 3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il); y se pueden usar otros nombres para identificar sin ambigüedad el compuesto del ejemplo 2.

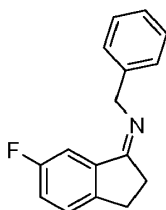
Como se usa en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados indicados. "DMEA" se refiere a dimetiletanolamina; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "ee" se refiere al exceso enantiomérico; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "CG/EM" se refiere a cromatografía de gases seguida de espectroscopia de masas; "CL" se refiere a cromatografía líquida; "CL / EM" se refiere a cromatografía líquida seguida de espectroscopia de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "EM" se refiere a espectrometría de masas; "RMN" se refiere a resonancia magnética nuclear; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "CCF" se refiere a cromatografía en capa fina; "UV" se refiere a rayos ultravioleta; y "XRD" se refiere a difracción de rayos X.

Ejemplo 1

- 10 Dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina

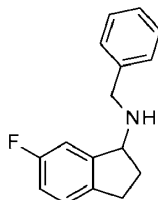


- 15 **Etapa 1:** Bencil-(6-fluoroindan-1-iliden)-amina

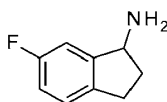


- 20 Combinar 6-fluoroindan-1-ona (14,57 g, 97,04 mmol) y bencilamina (10,60 ml, 97,04 mmol) en tolueno (75 ml). Añadir ácido *p*-toluenosulfónico monohidrato (0,923 g, 4,85 mmol). Unir un condensador de reflujo y calentar la mezcla en nitrógeno a reflujo durante seis horas, a continuación agitar a temperatura ambiente durante 14 horas. Extraer la mezcla con acetato de etilo y agua. Secar los extractos orgánicos resultantes con sulfato de magnesio, filtrar y concentrar al vacío, para dar el compuesto del título como un aceite rojo (23,22 g, 100 %). EM (ES) m/z = 240 [M+1].

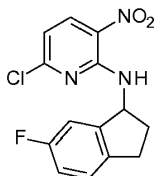
- 25 **Etapa 2:** Bencil-(6-fluoroindan-1-il)-amina



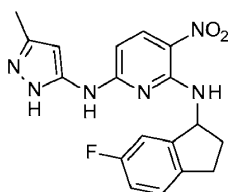
- 30 Disolver al bencil (6-fluoroindan-1-iliden)-amina (23,22 g, 97,03 mmol) en etanol (1.200 ml). Enfriar la mezcla a 0 °C en nitrógeno. Añadir borohidruro de sodio (11,01 g, 291,10 mmol) a la mezcla. Después de una hora, añadir diclorometano (150 ml) y agua (150 ml). Agitar durante 14 horas en nitrógeno y se concentra al vacío para eliminar el etanol. Extraer el residuo con diclorometano y cloruro sódico acuoso saturado. Secar los extractos orgánicos resultantes con sulfato de magnesio, filtrar y concentrar al vacío, para dar el compuesto del título como un aceite rojo (22,12 g, 94 %). EM (ES) m/z = 242 [M+1].

Etapa 3: 6-fluoroindan-1-ilamina

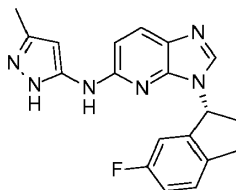
- 5 A un matraz de alta presión, añadir 10 % de paladio sobre carbono (1,44 g) en etanol (100 ml). Añadir una solución de bencil-(6-fluoroindan-1-il)-amina (14,44 g, 59,84 mmol) en etanol (200 ml). Purgar la cámara con nitrógeno tres veces y, después, con hidrógeno tres veces. Agitar enérgicamente en hidrógeno (0,41 MPa) a 50 °C durante dos horas. Filtrar la mezcla a través de Celite® 521 y se lavan los sólidos con metanol. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título como un líquido de color marrón claro (9,14 g, 100 %). EM (ES) $m/z = 152$ [M+1].

10 **Etapa 4:** 6-Cloro-N-(6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)-3-nitropiridin-2-amina

- 15 Disolver 6-fluoroindan-1-ilamina (8,50 g, 56,22 mmol) en metanol (200 ml) y trietilamina (8,62 ml, 61,84 mmol). Añadir 2,6-dicloro-3-nitropiridina (10,85 g, 56,22 mmol) y agitar en nitrógeno durante 14 horas. Filtrar la mezcla de reacción y lavar los sólidos con metanol y hexanos, para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (9,00 g, 52 %). EM (ES) $m/z = 308$ [M+1].

Etapa 5: N2-(6-fluoroindan-1-il)-N6-(5-metil-2H-pirazol-3-il)-3-nitropiridin-2,6-diamina

- 20
- 25 Combinar 6-cloro-N-(6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il)-3-nitropiridin-2-amina (9,00 g, 29,34 mmol) y 3-amino-5-metilpirazol (4,56 g, 46,95 mmol) en dimetilsulfóxido (60 ml). Añadir *N,N*-diisopropiletilamina (8,18 ml, 46,95 mmol) y calentar la reacción en nitrógeno a 120 °C durante 90 minutos. Verter la reacción en agua con hielo (200 ml) y agitar 20 minutos, después filtrar. Suspender el sólido obtenido en una mezcla de diclorometano y metanol y agitar a 40 °C durante 20 minutos. Filtrar la mezcla, para dar el compuesto del título como un sólido amarillo (6,03 g, 56 %). EM (ES) $m/z = 369$ [M+1].

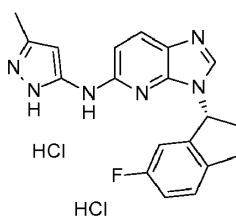
Etapa 6: 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina

- 30
- Disolver N2-(6-fluoroindan-1-il)-N6-(5-metil-2H-pirazol-3-il)-3-nitropiridin-2,6-diamina (0,571 g, 1,55 mmol) en metanol (10 ml). Añadir indio (0,890 g, 7,75 mmol) y ácido clorhídrico (12 N, 0,65 ml, 7,75 mmol). Agitar la mezcla en

nitrógeno durante una hora. Filtrar la mezcla de reacción a través de Celite® 521 y lavar los sólidos con metanol. Concentrar el filtrado al vacío, para proporcionar dihidrocloruro de N2-(6-fluoroindan-1-il)-N6-(5-metil-2H-pirazol-3-il)-piridin-2,3,6-triamina.

5 Disolver el dihidrocloruro de N2-(6-fluoroindan-1-il)-N6-(5-metil-2H-pirazol-3-il)-piridin-2,3,6-triamina en ácido acético (5 ml) y ortoformiato de trimetilo (0,68 ml, 6,20 mmol). Agitar en nitrógeno durante 30 minutos. Concentrar al vacío y purificar mediante cromatografía de fase inversa, eluyendo con un gradiente de ácido clorhídrico acuoso al 0,03 % en acetonitrilo, para dar el racemato del compuesto del título (0,124 g, 19 %, 2 etapas). EM (ES) $m/z = 349$ [M+1]. Separar el racemato con las condiciones de cromatografía quiral, para dar el compuesto del título: (70 mg, 11 %. Enantiómero 1 (primer eluyente a 3,7 min) > 99 % ee, 100 % MeOH, 0,2 % DMEA, 1,0 ml / min, 4,6 x 150 mm, CHIRALPAK® AD-H).

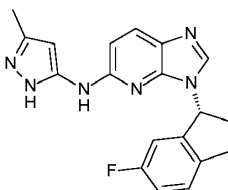
Etapa 7: Dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina



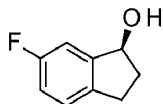
15 Disolver 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina (0,070 g, 0,201 mmol) en diclorometano (5 ml). Añadir cloruro de hidrógeno 4 M en 1,4-dioxano (0,100 ml, 0,400 mmol). Agitar la solución durante 14 horas, y después concentrar a sequedad al vacío. Disolver en metanol y concentrar hasta sequedad al vacío tres veces, para dar el compuesto del título (0,067 g, 79 %). EM (ES) $m/z = 349$ [M+1].

20 Ejemplo 2

3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina



25 **Etapa 1:** (1S)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol



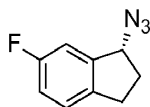
30 Equipar un matraz de fondo redondo de 22 l de 4 bocas con agitación aérea, termopar, embudos de adición de 1 l y 5 l, baño de refrigeración y entrada para nitrógeno. Bajo una purga de nitrógeno, cargar el matraz con 6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (500 g, 3,33 moles) y tolueno (5 l). Agitar la mezcla resultante durante 5 minutos para disolver todos los sólidos y, después, enfriar a -10 °C usando un baño de hielo / acetona. Cargar el embudo de adición de 1 l con R-(-)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (1M en tolueno, 666 ml, 0,666 mol). Añadir la solución a la mezcla de reacción y, a continuación, agitar durante 5 minutos. Cargar el embudo de adición de 5 l con tolueno (5 l), seguido de complejo de sulfuro de borano-metilo (310,1 ml, 3,33 mol). Después de revolver el embudo para mezclar los reactivos, añadir esta solución gota a gota a la mezcla de reacción durante 3 horas, manteniendo la temperatura del recipiente por debajo de -5 °C. Después de 15 minutos, vigilar una muestra de la reacción mediante CCF (inactivar 25 µl de mezcla de reacción con 50 µl de MeOH; 75/25 hexanos / EtOAc, UV). Este análisis muestra que

no queda material de partida. Dejar agitar la mezcla durante la noche en el baño frío.

- 5 Enfriar la mezcla de reacción a 10 °C y cargar el metanol (0,5 l) en el embudo de adición, después, añadir gota a gota durante 30 minutos. La liberación de gases es evidente al comienzo de la inactivación con MeOH, pero disminuye después de ~ 1/3 de la adición. Agitar la mezcla resultante durante 15 minutos y, a continuación, diluir con NaCl saturado (2,5 l). Después de agitar durante 20 minutos, filtrar la mezcla a través de una almohadilla de Hyflo Super Cel® y enjuagar la almohadilla con tolueno (2 l).

- 10 Transferir el filtrado a un matraz de salida inferior y separar las capas. Lavar la fase orgánica con agua desionizada (2,5 l), HCl 1N (2,5 l), NaHCO₃ saturado (20,5 l), y NaCl saturado (2,5 l). Después de secar sobre Na₂SO₄ (1 kg) en presencia de Darco (0,5 kg) durante 0,5 horas, filtrar la mezcla a través de Hyflo Super Cel® rematado con sílice Kieselgel 60 (0,5 kg). Enjuagar la almohadilla con tolueno (1 l) y concentrar el filtrado al vacío. Sembrar el aceite resultante con sólido preparado anteriormente para inducir la cristalización. La cristalización proporciona el compuesto del título como un sólido amarillo claro (500 g, 98,7 %, 98,1 % de ee). RMN de ¹H (CDCl₃, 500,0 MHz): δ 1,74 (sa, 1H), 1,99 (m, 1H), 2,54 (m, 1H), 2,77 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 5,22 (m, 1H), 6,95 (td, 1H), 7,09 (dd, 1H), 7,17 (td, 1H) ppm.

- 15 **Etapa 2:** (1R)-1-Azido-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-indeno

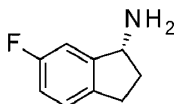


- 20 Equipar un matraz de 3 bocas de 22 l con agitación superior, termopar, entrada para nitrógeno, embudo de adición de 1 l y baño de refrigeración. Cargar el matraz con (1S)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-ol (700 g, 4,6 moles) y tolueno (7 l). Enfriar la solución resultante a 0-5 °C y añadir difenilfosforilazida (1,444 g, 5,1 mol) en una porción. Después de 15 minutos, cargar 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno (847 ml, 5,5 mol) en el embudo de adición, a continuación, añadir, gota a gota, al recipiente de reacción durante 2 horas, manteniendo la temperatura del recipiente por debajo de 10 °C. Retirar el baño y dejar agitar la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente.

- 25 Después de 22 horas, la CCF (80/20 hexano / EtOAc, UV) y la CG/EM indican que la reacción se ha completado. Añadir agua desionizada (3,5 l) durante 15 minutos y agitar durante 15 minutos. Transferir la mezcla a un matraz de salida inferior y separar las capas. Lavar las fases orgánicas con agua desionizada (3,5 l), a continuación HCl 0,5 M (3,5 l), y, finalmente, con agua desionizada (3,5 l). Combinar los tres lavados acuosos y retroextraer con tolueno (3,5 l). Combinar las fases orgánicas y secar sobre Na₂SO₄ (1 kg) en presencia de Darco (0,5 kg). Después de agitar durante 15 minutos, filtrar la mezcla a través de papel GFF cubierto con una almohadilla de Hyflo Super Cel®. Enjuagar la almohadilla con tolueno (1 l) y transferir el filtrado a un matraz de Büchi de 22 l y concentrar al vacío a ~ 4 volúmenes (2,8 l).

- 35 Configurar un embudo grande para cromatografía en tapón de gel de sílice y cargar con sílice Kieselgel 60 (6 kg). Cubrir la sílice con arena (1 kg) y humedecer con tolueno. Verter los 2,8 l de solución de reacción que contiene el producto en bruto en el embudo a ligero vacío. Eluir el producto con tolueno (4 x 4 l). Transferir el filtrado a un matraz tarado y concentrar al vacío (baño a 40 °C) a aproximadamente 3 l (2.788 g de solución de tolueno). Basado en el análisis del peso de la muestra pequeña (0,123 g de compuesto del título en 0,467g de solución de tolueno), hay 753,5 g de compuesto del título (7.782 g de solución en tolueno, 90, 2 % de rendimiento). Transferir la solución de tolueno a una jarra de galón (3,7 l) y guardar en el refrigerador para su uso en la siguiente etapa.

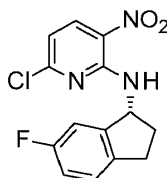
- 40 **Etapa 3:** (1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-amina



- 45 Cargar un tanque Hydro T-85 de 11,3 l con 5 % de Pd / C (8,2 g en 164 ml de tolueno) y un tercio de (1R)-1-azido-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-indeno (163,9 g de azida en 2.594 g de solución de etanol) obtenido en la etapa 2. Purgar el tanque con nitrógeno y, después, presurizar con hidrógeno (~ 50 psi). Agitar la mezcla durante 30 minutos. A continuación, airear el tanque y recargar con hidrógeno (~ 50 psi) y agitar durante otros 30 minutos. La CCF y la CG / EM muestran que la reacción se ha completado. Transferir la mezcla de reacción a una bombona y enjuagar el

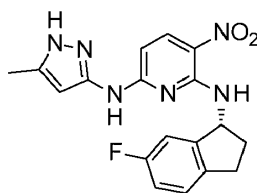
depósito con 3A-EtOH. Repetir la reacción a la misma escala dos veces. Combinar la solución de tres reacciones. Concentrar a presión reducida a aproximadamente 8 volúmenes. Filtrar la mezcla mediante papel GFF para eliminar el catalizador y enjuagar la almohadilla con 3A-EtOH (~ 200 ml). Basándose en el análisis de una muestra pequeña, se obtiene el compuesto del título en una solución de 3A-EtOH con un rendimiento del 92 % (386 g).

5 **Etapa 4:** 6-Cloro-N-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-3-nitropiridin-2-amina



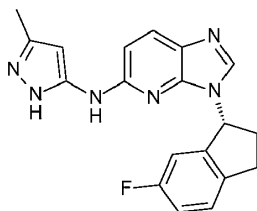
10 Purgar un matraz de 3 bocas de 12 l con nitrógeno y, después, montar un termopar, una manta térmica y un condensador. Cargar (1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-amina (386 g, 2,55 mol) en el matraz, añadir 3A-EtOH (3,9 l), diisopropiletilamina (1,34 l, 7,68 mol) y 2,6-dicloro-3-nitropiridina (643 g, 3,07 moles). Agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante ocho horas, seguido de calentamiento a 70 °C durante 12 horas. Enfriar la mezcla de reacción a 8 °C durante 1,25 horas, después filtrar sobre una almohadilla de polipropileno. Lavar los sólidos con 3A-EtOH (760 ml), transferir a un plato tarado y secar adicionalmente en un horno de vacío (45 °C), para dar el compuesto del título como un sólido naranja (786 g, 71 %, 98,0 % ee). CG/EM (m/z): 307 (M+).

15 **Etapa 5:** N2-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N6-(3-metil-1H-pirazol-3-il)-3nitropiridina-2,6-diamina



20 Equipar un matraz de 3 bocas (22 l) con un termopar, un condensador, un agitador aéreo, una entrada para N₂ y una manta térmica. Cargar en el matraz 6-cloro-N-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-3-nitropiridin-2-amina (600 g, 1,95 mol), 5-metil-1H-pirazol-3-amina (208,31 g, 2,14 mol), dimetilsulfóxido (6,0 l), y diisopropiletilamina (680,11 ml, 3,90 moles). Agitar la solución a 70 °C durante 20 horas. Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y diluir con MeOH (6,0 l). Añadir agua desionizada (2,1 l) a la solución durante una hora, para dar una suspensión de color naranja. Agitar la suspensión durante una hora y, después, filtrar a través de polipropileno. Lavar la torta del filtro con agua desionizada (12 l), transferir el sólido a un plato tarado y secar al vacío (50 °C) hasta un peso constante, para proporcionar el compuesto del título (647 g, 90 %). EM (m/z): 369 (M+1).

25 **Etapa 6:** 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina



30 Añadir N2-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N6-(3-metil-1H-pirazol-3-il)-3nitropiridina-2,6-diamina (622 g, 1,69 mol) en un matraz de fondo redondo de 10 l y tratarla con DMF (5 l). Revolver el contenido del matraz hasta que todos los sólidos se disuelven. Cargar el matraz con trimetilortoformiato (1,85 l, 16,9 mol) y *p*-toluenosulfonato de piridinio (42,4 g, 0,169 mol) con agitación suave. Cargar el tanque Hydro T-85 de 11,3 litros con 5 % de Pd / C (93,3 g, 15 5 en peso de la carga) como una suspensión espesa en DMF (100 ml) bajo una purga de nitrógeno. Añadir la

mezcla anterior al tanque hydro y purgar con nitrógeno varias veces, y, a continuación, cargar el tanque en hidrógeno (~ 50 psi). Calentar la mezcla a 60 °C y dejar agitar durante la noche. En aproximadamente 22 horas, ventilar el reactor, tomar una muestra y comprobar mediante CCP y CL / EM, los cuales indican que la reacción se ha completado. Filtrar la mezcla a través de una almohadilla de Hyflo Super Cel® y enjuagar el tanque y la almohadilla con EtOAc (1 l). Transferir el filtrado a un matraz de Büchi, diluir con agua desionizada (622 ml) y concentrar al vacío (baño de 50 °C) para eliminar el exceso de ortoformiato de trimetilo. Transferir la solución de DMF a un matraz de salida inferior de 50 l y diluir con EtOAc (12,4 l). Lavar la solución con solución de LiCl saturado (3 x 6,22 l). Combinar los lavados acuosos y retroextraer con EtOAc (4 x 3,11 l). Combinar las fases orgánicas y lavar con LiCl saturado (2 x 1 l), secar sobre Na₂SO₄ y filtrar a través de papel GFF. Concentrar el filtrado al vacío (baño a 45 °C), para dar el producto bruto como un sólido verde (609 g, 103,5 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500,0 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,67 (q, 2H), 2,99 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 5,89 (s, 1H), 6,11 (t, 1H), 6,76 (dd, 1H), 6,87 (d, 1H), 7,10 (td, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 9,23 (sa, 1H), 11,65 (sa, 1H) ppm.

Equipar un matraz de 3 bocas (22 l) con un termopar, un condensador, un agitador aéreo, una entrada para N₂ y una manta térmica. Cargar en el matraz el material bruto, hecho directamente arriba, (598,5 g, 1,7 mol) y acetonitrilo (12 l) y calentar la mezcla resultante hasta reflujo. Una vez completada la solución, detener la fuente de calor y permitir que la solución se enfríe por sí sola. Sembrar la solución con el sólido verde desde arriba a 56 °C y la cristalización comienza inmediatamente; el material de siembra inicial se obtiene esencialmente como anteriormente. Enfriar aún más la suspensión con un baño de hielo, agitar durante la noche, y filtrar. Lavar la torta del producto con acetonitrilo (1,2 l), transferir los sólidos a un plato tarado y secar al vacío (50 °C) hasta un peso constante, para proporcionar el compuesto del título (349,54 g, 58,4 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500,0 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,67 (q, 2H), 2,99 (m, 1H), 3,17 (m, 1H), 5,89 (s, 1H), 6,11 (t, 1H), 6,76 (dd, 1H), 6,87 (d, 1H), 7,10 (td, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,99 (s, 1H), 9,23 (sa, 1H), 11,65 (sa, 1H) ppm.

Difracción de rayos X en polvo

Los patrones de XRD de sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro en polvo de rayos X Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuKα (λ = 1,54060 Å) y un detector de Vantec, que funciona a 35 kV y a 50 mA. La muestra se explora entre 4 y 40° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,0087° en 2θ y a una velocidad de exploración de 0,5 segundos/etapa, y con divergencia de 0,6 mm, hendidura fija antidispersión de 5,28, y hendiduras de detector de 9,5 mm. El polvo seco se envasa en un portador de muestras de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando una lámina de vidrio. Es bien conocido en la técnica cristalográfica que, para cualquier forma cristalina dada, las intensidades relativas de los picos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida resultante de factores tales como la morfología cristalina y el hábito. Cuando los efectos de orientación preferida están presentes, las intensidades del pico se alteran, pero las posiciones de los picos característicos del polimorfo se mantienen sin cambios. Además, también es bien conocido en la técnica cristalográfica que para cualquier forma cristalina dada las posiciones de los picos angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se analiza una muestra, el desplazamiento de la muestra, o la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad de posición de pico de ± 0,2 en 2θ tomará en cuenta estas variaciones de potencial sin entorpecer la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina puede hacerse en base a cualquier combinación única de picos distintivos (en unidades de ° 2θ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de formas cristalinas, recogidos a temperatura ambiente y a humedad relativa ambiente, se ajustan en base a picos estándar NIST 675 a 2-teta de 8,85 y de 26,77 grados.

Por lo tanto, una muestra preparada del Ejemplo 2 se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuKα como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 a continuación. Específicamente, el patrón contiene un pico a 16,11 en combinación con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste de 4,32, 8,71, 13,12, 15,19 y 18,86, con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción de rayos X en polvo del ejemplo 2

Pico	Ángulo (2-Theta)	Intensidad (%)
1	4,32	30
2	6,95	19
3	8,71	23
4	12,21	14
5	13,12	34
6	13,29	23

(continuación)

7	15,19	48
8	16,11	100
9	17,66	20
10	18,86	62
11	18,98	46
12	19,49	74
13	20,25	35
14	21,94	16
15	24,02	33

Ensayos enzimáticos in vitro de JAK1/2/3

- 5 Se usa en el ensayo JAK LanthaScreen™ Kinase Assay (Life Technologies, #PV4844) para determinar los valores de CI_{50} del compuesto contra las cinasas JAK1, JAK2 y JAK3. Este ensayo de cinasa es un formato de ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelto en el tiempo (TR-FRET) que utiliza anticuerpo marcado con terbio (Tb) de vida larga como la especie donante y proteína verde fluorescente -transductores de la señal y activadores de la transcripción (GFP-STAT1) como la especie aceptora.
- 10 La relación de TR-FRET se utiliza para controlar la actividad JAK1, JAK2, JAK3, en la que un aumento de la fosforilación de GFP-STAT1 da lugar a un aumento de la relación de TR-FRET. Realizar la reacción de la cinasa utilizando un volumen de reacción de 12,5 microlitros en placas Proxiplate de 384 pocillos de fondo poco profundo (PerkinElmer, # 6008260). Añadir los reactivos para obtener condiciones de reacción finales de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2'etanosulfónico (HEPES) 50 mM a pH 7,3, Triton™ X-100 1,76 milimolar, adenosina trifosfato (ATP) 20,0 micromolar para el ensayo de JAK1 (ATP 5 micromolar para el ensayo de JAK2, o ATP 2
- 15 micromolar para el ensayo de JAK3), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 10,0 milimolar, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 1 milimolar, 0,01 % de Brij-35, proteína fluorescente verde- transductores de la señal y activadores de la transcripción (GFP-STAT1) 0,05 micromolar, enzima AK1 14 nanomolar (o enzima JAK2 1,0 nanomolar, o enzima JAK3 2,5 nanomolar) y 4 % de dimetilsulfóxido y diluciones en serie del compuesto del ejemplo 1 (diluido 1: 3 de 20
- 20 000 a 1 nanomolar). Después de añadir ATP/GFP-STAT1, centrifugar las placas de ensayo durante 1 minuto a 1.000 revoluciones por minuto (RPM). Dejar incubar las placas a temperatura ambiente durante 60 minutos y, después, detenerlo con la adición de 12,5 microlitros de un tampón de detención que contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 milimolar, Tb-anti-pSTAT1 [pTyr701] 2 nanomolar, dihidrocloruro de tris(hidroximetil)aminoetano (Trizma®) 0,67 milimolar a pH 7,5, azida de sodio al 0,02 % y nonilfenilpolietilenglicol al 0,01 % Nonidet® P40).
- 25 Incubar a temperatura ambiente durante 90 minutos y leer en un lector de placas Envision (PerkinElmer, # 2.104-0.010) con filtro de longitud de onda de excitación de 340 nm y filtros de de emisión a las longitudes de onda de 520 nm y 495 nm. La relación se obtiene de la longitud de onda de emisión para GFP-STAT1, que se mide a 520 nanómetros frente a la emisión a 495 nanómetros para el Tb-anti-pSTAT1 [pTyr701]. Obtener el valor de la CI_{50} para el compuesto a partir de datos del porcentaje de inhibición, que se calcula a partir de los datos de reacción en
- 30 relación con los controles en la placa (enzima activa frente a enzima inhibida con el control 2,0 micromolar). Usar ActivityBase 4,0 para ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de concentración del compuesto a diez puntos a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Se determina que el compuesto del Ejemplo 1 tiene una CI_{50} de 1,7 nM +/- 0,8 nM contra JAK1 (n = 3), una CI_{50} de 1,7 nM contra JAK2 (n = 1), y una CI_{50} de 8,0 nM +/- 5,9 nM contra JAK3 (n = 6). El compuesto del Ejemplo 1 demostró una selectividad mayor que cuatro veces para JAK1 y JAK2 sobre JAK3 en los ensayos enzimáticos. Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un potente inhibidor *in vitro* de la JAK1 y la JAK2, y es selectivo *in vitro* para JAK1 y JAK2 sobre JAK3.

Ensayo basado en células de JAK2 EPO-TF I/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan® HCS

- 40 El ensayo basado en las células JAK2 EPO-TFL / pSTAT5 imita la activación constitutiva de JAK2-STAT5 en células progenitoras eritroides, que impulsa la sobreproducción de glóbulos rojos de la sangre, un marcador de la policitemia vera (PV). Por lo tanto, el ensayo basado en células EPO-TFL / pSTAT5 permite la evaluación de la actividad celular

de JAK2 de los compuestos JAK *in vitro*.

Las células TF-1 (leucemia eritroide humana) se mantienen en medio RPMI 1640 (RPMI-1640 desarrollado por Moore et. al. en Roswell Park Memorial Institute. La formulación se basa en una serie de medios RPMI-1630 usando un sistema tampón bicarbonato y alteraciones en las cantidades de aminoácidos y vitaminas) con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 0,075 % de bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 1 mM, 1x de antibiótico / antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0,45 % de glucosa. El medio se complementa con GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) a una concentración final de 2 ng / ml. Las células se mantienen a 37 °C con 5 % de CO₂. Se priva a las células de alimentación en medio sin suero para eliminar los factores de crecimiento endógenos. Se realiza un recuento de las células TF-1 y se recogen las células para sembrar 2 x 10⁷ células por placa de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10⁵ células por pocillo. Las células se lavan dos veces con RPMI 1640 sin suplementar (RPMI 1640 con de 0,075 % de bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 1 mM, 1 x antibiótico / antimicótico, y 0,45 % de glucosa) antes de suspender las células a una concentración final de 5 x 10⁵ células / ml en RPMI con 0,6 de FBS. Las células diluidas se añaden de nuevo a frascos de cultivo tisular y se incuban durante la noche a 37 °C. El compuesto de ensayo se prepara en 100 % de DMSO a una concentración de 10 mM. El compuesto se diluye en serie a 1:3 con DMSO al 100 % en un intervalo de 200 x concentración-respuesta de 10 puntos (4 mM-200 nM). En una placa de 96 pocillos de fondo profundo aparte se añaden 2,5 µl de solución 200x del compuesto a 125 µl de medio RPMI completo 1640 con 10 % de FBS para una placa de compuesto a una concentración 4x.

Para realizar el ensayo, se cosechan las células privadas de suero y se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suplementar. Las células se suspenden en medio RPMI completo con 10 % de FBS para una concentración final de 8 x 10⁵ células / ml. Se añade una alícuota de 250 µl de células diluidas (2 x 10⁵ células) a cada pocillo en la placa del compuesto a una concentración 4x. Las células se mezclan mediante agitación con vórtex y se incuban la placa en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Una solución 4x de trabajo fresca de eritropoyetina (EPO) a 6,4 unidades / ml se prepara mediante el uso de medio RPMI 1640 completo con 10 % de FBS. Después de tratar las células con el compuesto durante 10 minutos, se añaden 125 µl de medio EPO en cada pocillo y la placa se agita en vórtex. Las células se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos y se mezclan cada 5 minutos durante el tiempo de incubación. El intervalo final de concentración-respuesta de 10 puntos es de 20 µM-1 nM a una concentración final de DMSO al 0,5 % y EPO en 1,6 U / ml. Después del tratamiento de las células, a cada pocillo se añaden 500 µl de solución de formaldehído al 1 % (recién preparada solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se mantiene caliente a 37 °C). Las placas se sellan y se dan la vuelta 8-10 veces para mezclar. Las placas se colocan en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, las placas de células se centrifugan a 1.200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Se aspira el sobrenadante, dejando 100 µl de células (2 x 10⁵ células). Las células se agitan en vórtex y se lavan dos veces con 800 µl de PBS mediante la repetición de las etapas de centrifugación y dejando 100 µl con ~ 2 x 10⁵ células después del lavado final. Una parte alícuota de 800 µl de metanol frío al 90 % se añade a las células y se introduce a -20 °C durante la noche. Las placas se centrifugan y se retira el metanol. Las células se lavan con tampón FACS (PBS con 5 % de FBS y 0,02 % de azida sódica). Se añade a las células una parte alícuota de 200 µl de una dilución 1 a 10 de anti-pSTAT5 (pY694) de ratón Alexa Fluor 647® en tampón para clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células se mezclan bien y se incuban a TA en oscuridad durante 2 horas. Las células se lavan una vez con PBS y se dejan 100 µl de células. Una solución de trabajo de 2 µg / ml de Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) se prepara con PBS. A cada pocillo se añade una parte alícuota de 200 µl se y las células se incuban a TA en oscuridad durante 10 minutos. Las células se lavan con PBS y a las células se añaden 50 µl de Cytfix (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se transfieren a placas de cultivo tisular negras de 96 pocillos y se sellan. Las placas se centrifugan. Los datos de la intensidad media de fluorescencia se recogen y se analizan mediante Cellomics ArrayScan® Vti. El tratamiento con el compuesto se compara con el vehículo para determinar los datos de porcentaje de inhibición. La CI₅₀ relativa se calcula usando una análisis de ajuste de la curva de logística de 4 parámetros con ActivityBase 4.0.

Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 inhibe la JAK2 con una CI₅₀ de 0,035 µM +/- 0,013 µM (n = 65). Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un potente inhibidor de JAK2 en el ensayo basado en células JAK2 EPO-TF I / pSTAT5.

Ensayo basado en células de JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 - Cellomics ArrayScan® HCS

La IL-2 activa la ruta de la JAK3 en las células asesinas naturales (NK) para dirigir la proliferación de linfocitos NK y CD8. Por lo tanto, el ensayo basado en células NK92 /pSTAT5 estimuladas con IL-2 permite la evaluación de la actividad celular de JAK3 de los compuestos JAK *in vitro*

Células NK-92 (asesinas naturales) (ATCC, Manassas, VA) se mantienen en medio esencial mínimo (MEM) alfa con 15 % de suero bovino fetal, 15 % de suero de caballo y 1x de antibiótico / antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio se suplementa con IL-2 (R & D Systems, Minneapolis, MN) para una concentración final de 4 ng / ml. Las células se mantienen a 37 °C con 5 % de CO₂. Se priva a las células de alimentación en medio sin suero para eliminar los factores de crecimiento endógenos. Se realiza un recuento de las células NK-92 y se recogen las células para sembrar 2 x 10⁷ células por placa de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10⁵ células por pocillo. Las células se lavan dos veces con MEM alfa sin suplementar (MEM Alfa) antes de suspender las células a una concentración final

de 8×10^5 células / ml en MEM alfa con 0,6 % de suero (0,3 % de FBS, 0,3 % de suero de caballo). Las células diluidas se añaden de nuevo a frascos de cultivo tisular y se incuban durante la noche a 37 °C. El compuesto de ensayo se prepara en 100 % de DMSO a una concentración de 10 mM. El compuesto se diluye en serie a 1:3 con DMSO al 100 % en un intervalo de 200 x concentración-respuesta de 10 puntos (4 mM-200 nM). En una placa de 96 pocillos de fondo profundo aparte se añaden 2,5 µl de solución 200x del compuesto a 125 µl de medio RPMI 1640 completo con 10 % de FBS para una placa de compuesto a una concentración 4x. Para realizar el ensayo, se cosechan las células privadas de suero y se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suplementar. Las células se suspenden en medio RPMI 1640 completo con 10 % de FBS para una concentración final de 8×10^5 células / ml. Se añade una alícuota de 250 µl de células diluidas (2×10^5 células) a cada pocillo en la placa del compuesto a una concentración 4x. Las células se mezclan mediante agitación con vórtex y se incuban la placa en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Una solución 4x de trabajo fresca de IL-2 a 2 ng/ml se prepara mediante el uso de medio RPMI completo con 10 % de FBS. Después de tratar las células con el compuesto durante 10 minutos, se añaden 125 µl de medio IL-2 en cada pocillo. Las células se mezclan en vórtex. Las células se incuban en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos y se mezclan cada 5 minutos durante el tiempo de incubación. El intervalo final de concentración-respuesta de 10 puntos es de 20 µM-1 nM a una concentración final de DMSO al 0,5 % e IL-2 a 0,5 U / ml. Después del tratamiento de las células, a cada pocillo se añaden 500 µl de solución de formaldehído al 1 % (recién preparada solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se mantiene caliente a 37 °C). Las placas se sellan y se dan la vuelta 8-10 veces para mezclar. Las placas se colocan en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, las placas de células se centrifugan a 1.200 rpm durante 5 min a TA. Se aspira el sobrenadante, dejando 100 µl de células (2×10^5 células). Las células se agitan en vórtex y se lavan dos veces con 800 µl de PBS mediante la repetición de las etapas de centrifugación y dejando 100 µl con $\sim 2 \times 10^5$ células después del lavado final. Una parte alícuota de 800 µl de metanol frío al 90 % se añade a las células y se introduce a -20 °C durante la noche. Las placas se centrifugan y se retira el metanol. Las células se lavan con tampón FACS (PBS con 5 % de FBS y 0,02 % de azida sódica). Se añade a las células una parte alícuota de 200 µl de una dilución 1 a 10 de anti-pSTAT5 (pY694) de ratón Alexa Fluor 647® en tampón para clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Las células se mezclan bien y se incuban a TA en oscuridad durante 2 horas. Las células se lavan una vez con PBS y se dejan 100 µl de células. Una solución de trabajo de 2 µg / ml de Hoechst (Acros Organics, Morris Plains, NJ) se prepara con PBS. A cada pocillo se añade una parte alícuota de 200 µl y se lavan las células se incuban a TA en oscuridad durante 10 minutos. Las células se lavan con PBS y a las células se añaden 50 µl de Cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se transfieren a placas de cultivo tisular negras de 96 pocillos y se sellan. Las placas se centrifugan. Los datos de la intensidad media de fluorescencia se recogen y se analizan mediante Cellomics Arrayscan® VTi. El tratamiento con el compuesto se compara con el vehículo para determinar los datos de porcentaje de inhibición. La CI_{50} relativa se calcula usando una análisis de ajuste de la curva de logística de 4 parámetros con ActivityBase 4.0.

Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 inhibe la JAK3 con una CI_{50} de 0,228 µM +/- 0,076 µM (n = 61). A partir de los resultados de los dos ensayos basados en células anteriores, la relación de JAK3 / JAK2, se determinó que la CI_{50} era más de seis veces, lo que demuestra que el compuesto del Ejemplo 1 es selectivo para JAK2 sobre JAK3 en los ensayos basados en células EPO-TF I/pSTAT5 y JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5.

40 **Ensayo basado en células DS1-AlphaScreen-pSTAT3**

El ensayo basado en células -DS1-AlphaScreen-pSTAT3 se utiliza para examinar la potencia de los compuestos en el bloqueo de la ruta STAT3 estimulada por IL6. La ruta de JAK-STAT3 es constitutivamente activo en muchos tipos de cáncer y está implicada en las células tumorales para incrementar la proliferación, la supervivencia, y la invasión. Las células DS1 (ATCC) se cultivan en medio completo RPMI con 10 % de FBS y, después, se adoptan y se cultivan en medio DMEM / medio modificado alto suplementado con 10 % de FBS a 37 a.C. a una humedad del 95 % y en una atmósfera de 5 % CO₂. Las células DS1 se siembran en placas a una densidad de 4×10^4 células / pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivan en medio de cultivo libre de suero a 37 °C durante tres horas, seguido de pre-tratamiento con el vehículo solo (DMSO) o con compuestos de ensayo a través de una gama de concentraciones finales de 0 a 20 µM durante 10 min. Después se añade IL6 (R&D System, 206-IL) al cultivo celular a 10 ng / ml de concentración final, que se continua durante 30 minutos adicionales a 37 °C. Por último, las células se lisan con 5x de tampón de lisis alfa y se transfieren a una placa de 384 pocillos (PerkinElmer, # 6008280) llena con la mezcla de reacción (TGR Biosciences, South Australia, Australia, #TGRS3S10K) para la detección de pSTAT3 (# TGRS3SHV100). Las placas se sellan y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas, y el pSTAT3 se mide usando un lector de placas Envision06 (TGR Biosciences, South Australia, Australia). Los datos se analizan con ActivityBase 4.0.

Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 inhibe la señalización de IL-6-STAT3 con una CI_{50} de 0,066 +/- 0,023 µM. Estos resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la ruta de JAK-STAT3 estimulada por IL-6 en el ensayo basado en células DS1-AlphaScreen-pSTAT3.

60 **Ensayo basado en células Mia-Paca2-MSD-pSTAT3**

El ensayo basado en células Mia-Paca2-MSD (MesoScale Diagnostics)-pSTAT3 se usa para examinar la potencia

- de los compuestos en el bloqueo de la fosforilación de STAT3 en células de cáncer pancreático. Las células Mia-paca2 (ATCC) se cultivan en medio DMEM completo suplementado con 10 % de FBS a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO₂. Después, se recogen las células, se cuentan, se siembran en placas de 96 pocillos a 4x10⁴ células / pocillo y se cultivan durante la noche a 37 °C con 5 % de CO₂. El medio de cultivo se retira de las células y se reemplaza con medio libre de suero que contiene vehículo solo (DMSO) o 2X las concentraciones finales de los compuestos en un intervalo de 0-20 µM a una dilución de 1:3 (10 diluciones). Después de la incubación durante 5 horas adicionales, se añaden 100 microlitros de sobrenadante del cultivo MIA PACA2 de 10 días (medio acondicionado) a las placas para activar STAT3. Las células se tratan durante 20 minutos adicionales a 37 °C en una incubadora suministrada con 5 % de CO₂. Después de la estimulación, todo el medio se retira manualmente como de ha indicado anteriormente y las células se lisan en 50 microlitros de hielo frío con 1X de tampón de lisis (MSD mesoescala Diagnostics, K150DID-2), que contiene 1X del cóctel de proteasa HALT e inhibidor de fosfatasa (Thermo Scientific, 78441). Las placas de 96 pocillos se sellan y después se mezclan durante 2 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente, y, después, se congelan inmediatamente a -80 °C durante la noche. Se detecta pSTAT3 con el uso del kit MA6000 MSD Whole Cell Lysate Kit para fosfo-STAT-3 (Tyr 705) (MesoScale Diagnostics, # K150DID-2) como sigue, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1-2 horas con agitación y después se lavan 4 veces con tampón de lavado. Se añaden 25 µl de lisado proteico a cada pocillo y se incuban las placas durante 1-2 horas adicionales. Leer las placas con lector de placas MSD 6000 después de lavar las placas 4 veces con el tampón de lavado, los datos se analizan utilizando el programa Graph Pad.
- Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 inhibe la fosforilación de STAT3 con una CI₅₀ de 12 nM. Estos resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la ruta de JAK-STAT3 en una línea celular de cáncer de páncreas.

Ensayo basado en células SUM-159-MSD-pSTAT3

- El ensayo basado en células SUM-159-MSD-pSTAT3 se usa para examinar la potencia de los compuestos en el bloqueo de la fosforilación de STAT3 en células de cáncer de mama. Se cultivan células SUM-159 (Asterand) y se mantienen en medio F-12 de HAM (Gibco 11765-054) con 5 % de FBS, insulina (5 microgramos / ml) e hidrocortisona (1 µg / ml). Se recogen las células, se cuentan, se siembran en placas de 96 pocillos a 4x10⁴ células / pocillo y se cultivan durante la noche a 37 °C con 5 % de CO₂. A continuación se retira el medio de cultivo y se reemplaza con medio F-12 que contiene vehículo solo (DMSO) o 2X las concentraciones finales de los compuestos en un intervalo de 0-20 µM a diluciones de 1:3 (10 puntos de concentración). Después de incubación durante cinco horas adicionales, se retira el medio y las células se tratan con 100 microlitros de 2X IL-6 humana (20 ng / ml diluido en medio F-12 completo) y se incuban durante 20 minutos a 37 °C en 5 % de CO₂. Después de la estimulación, todo el medio se retira manualmente como de ha indicado anteriormente y las células se lisan en 50 microlitros de hielo frío con 1X de tampón de lisis, que contiene 1X del cóctel de proteasa HALT e inhibidor de fosfatasa. Las placas de 96 pocillos se sellan y después se mezclan durante 2 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente y después se congelan inmediatamente a -80 °C durante la noche. Se detecta pSTAT3 con el uso del kit MA6000 MSD Whole Cell Lysate Kit para fosfo-STAT-3 (Tyr 705) (Meso Scale Diagnostics, # K150DID-2) como se ha divulgado anteriormente. Las placas se leen utilizando un lector de placas MSD. Los datos se analizan usando el programa Graph Pad
- Un compuesto dentro del alcance de la invención se analiza en este ensayo sustancialmente como anteriormente. El compuesto del Ejemplo 1 inhibe la fosforilación de STAT3 con una CI₅₀ de 21 nM. Estos resultados muestran que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe la ruta de JAK-STAT3 en una línea celular de cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es dihidrocloruro de 3-[(1R)-6-fluoro-2,3-dihidro-1H-inden-1-il]-N-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-5-amina.
4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 10 5. El compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en terapia.
6. El compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 7. El compuesto o la sal para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, carcinoma de páncreas, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular y cáncer de colon.