

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 606**

51 Int. Cl.:

<b>C07D 491/107</b>	(2006.01)	<b>A61P 19/02</b>	(2006.01)
<b>C07D 498/08</b>	(2006.01)	<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/397</b>	(2006.01)	<b>A61P 29/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/407</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/438</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/5386</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 3/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/06</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2013 PCT/AU2013/000687**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14000032**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013 E 13809739 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2867238**

54 Título: **Compuestos bicíclicos de fenil amino pirimidina y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**29.06.2012 US 201261666725 P**  
**14.03.2013 US 201313830152**  
**21.03.2013 AU 2013201780**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2017**

73 Titular/es:

**YM BIOSCIENCES AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)**  
**2nd Floor 499 St Kilda Road**  
**Melbourne, VIC 3004, AU**

72 Inventor/es:

**BURNS, CHRISTOPHER JOHN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 644 606 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos bicíclicos de fenil amino pirimidina y usos de los mismos

Campo

5 La presente invención se refiere a compuestos bicíclicos de fenil amino pirimidina que son inhibidores de proteína quinasas, que incluyen quinasas JAK. En particular los compuestos son activos contra quinasas JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Los inhibidores de quinasa se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinasas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

10 Antecedentes

Las JAK son quinasas que fosforilan un grupo de proteínas llamado transducción de señal y activadores de transcripción o STATS. Cuando se fosforilan, los STAT se dimerizan, se translocan al núcleo y activan la expresión de genes que conducen a, entre otras cosas, la proliferación celular.

15 La función central desempeñada por la familia JAK de proteína tirosina quinasas en la regulación dependiente de citoquinas tanto de la proliferación como la función final de diversos tipos de células importantes indica que los agentes capaces de inhibir las quinasas JAK son útiles en la prevención y el tratamiento quimioterapéutico de estados de enfermedad dependientes de estas enzimas. Inhibidores potentes y específicos de cada uno de los cuatro miembros de la familia JAK actualmente conocidas proporcionarán un medio para inhibir la acción de las citoquinas que llevan a enfermedades inmunológicas y enfermedades inflamatorias y enfermedades hiperproliferativas como el cáncer.

20 Los trastornos mieloproliferativos (MPD) incluyen, entre otros, policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitemia, trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis idiopática (IMF), leucemia mielógena crónica (CML), mastocitosis sistémica (SM), leucemia neutrofílica crónica (CNL), síndrome mielodisplásico (MDS) y enfermedad sistémica de mastocitos (SMCD). JAK2 es un miembro de la familia de quinasas JAK en la que se ha encontrado una mutación específica (JAK2V617F) en el 99% de pacientes con policitemia vera (PV) y 50% de la trombocitopenia esencial (ET) y mielofibrosis idiopática (MF). Se considera que esta mutación activa JAK2, dando peso a la proposición de que un inhibidor de JAK2 será útil en el tratamiento de estos tipos de enfermedades.

25 El asma es un trastorno complejo que se caracteriza por inflamación alérgica local y sistémica y la obstrucción reversible de las vías respiratorias. Los síntomas del asma, especialmente la falta de aire, son una consecuencia de la obstrucción de las vías respiratorias, y la muerte casi siempre se debe a la asfixia. La Hipersensibilidad de las Vías Respiratorias (AHR), y la hipersecreción de moco por las células caliciformes son dos de las principales causas de la obstrucción de las vías respiratorias en pacientes con asma. Curiosamente el trabajo reciente en modelos experimentales con animales de asma ha subrayado la importancia de la IL-13 como un actor clave en la patogénesis del asma. Utilizando un bloqueador IL-13 específico, se ha demostrado que la IL-13 actúa de manera independiente de la IL-4 y puede ser capaz de inducir todo el fenotipo de asma alérgica, sin la inducción de IgE (es decir, de una manera no atópica). Este y otros modelos han señalado un importante segundo mecanismo de nivel para provocar la fisiopatología del asma, que no es dependiente de la producción de IgE mediante células B residentes o la presencia de eosinófilos. Una inducción directa de AHR por IL-13, representa un proceso importante que es probable sea un objetivo excelente para la intervención de nuevas terapias. Un efecto contemplado de un inhibidor de JAK1, JAK2 y/o TYK2 a los pulmones daría lugar a la supresión de la liberación local de producción de IgE mediada por IL-13, y por lo tanto la reducción en la liberación de histamina por los mastocitos y eosinófilos. Estas y otras consecuencias de la ausencia de IL-13 indican que muchos de los efectos del asma se pueden aliviar a través de la administración de un inhibidor de JAK1, JAK2 y/o TYK2 a los pulmones.

30 La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD) es un término que se refiere a un gran grupo de enfermedades pulmonares que pueden interferir con la respiración normal. Las directrices clínicas actuales definen la COPD como un estado de enfermedad caracterizado por una limitación del flujo de aire que no es totalmente reversible. La limitación del flujo de aire es generalmente progresiva y se asociada con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos, particularmente el humo del cigarrillo y la contaminación. Diversos estudios han señalado una asociación entre el aumento de producción de IL-13 y la COPD, lo que lleva a respaldar la proposición de que el alivio potencial de los síntomas del asma mediante el uso de un inhibidor de JAK2, también se puede conseguir en la COPD. Los pacientes con COPD tienen una variedad de síntomas que incluyen tos, falta de aliento, y la producción excesiva de esputo. La COPD incluye diversos síndromes respiratorios clínicos, que incluyen bronquitis crónica y enfisema.

35 La bronquitis crónica es una inflamación de los bronquios de larga duración que provoca un aumento de la producción de moco y otros cambios. Los síntomas del paciente son tos y expectoración de esputo. La bronquitis crónica puede conducir a infecciones respiratorias más frecuentes y graves, estrechamiento y obstrucción de los bronquios, dificultad para respirar y discapacidad.

El enfisema es una enfermedad pulmonar crónica que afecta a los alvéolos y/o los extremos más pequeños de los bronquios. El pulmón pierde su elasticidad y por lo tanto se agrandan estas áreas de los pulmones. Estas áreas agrandadas atrapan el aire viciado y no se presenta un intercambio efectivo con aire fresco. Esto resulta en respiración difícil y puede dar como resultado insuficiencia del oxígeno que se suministra a la sangre. El síntoma predominante en los pacientes con enfisema es la falta de aire.

Adicionalmente, se proporciona evidencia de la activación de STAT en los tumores malignos, entre ellos cáncer de pulmón, mama, colon, ovario, próstata e hígado, así como linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple y carcinoma hepatocelular. Las translocaciones cromosómicas que implican fusiones de JAK2 a Tel, Bcr y PCM1 se han descrito en una serie de tumores malignos hematopoyéticos que incluyen leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), crónica leucemia eosinofílica (CEL), síndrome mielodisplásico (MDS), enfermedad mieloproliferativa (MPD) y leucemia linfocítica aguda (ALL). Esto sugiere que se indica el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como cánceres, que incluyen mieloma múltiple; cáncer de próstata, mama y pulmón; linfoma de Hodgkin; CML; AML; CEL; MDS; ALL; leucemia linfocítica crónica de células B; melanoma metastásico; glioma; y hepatoma, por los inhibidores de JAK.

Los inhibidores potentes de JAK2, además de lo anterior, también son útiles en la enfermedad vascular tal como hipertensión, hipertrofia, isquemia cardíaca, insuficiencia cardíaca (que incluyen insuficiencia cardíaca sistólica y insuficiencia cardíaca diastólica), migraña y trastornos cerebrovasculares relacionados, accidente cerebrovascular, fenómeno de Raynaud, síndrome de POEMS, angina de Prinzmetal, vasculitis, tales como arteritis de Takayasu y granulomatosis de Wegener, enfermedad arterial periférica, enfermedad cardíaca e hipertensión arterial pulmonar.

La hipertensión arterial pulmonar (PAH) es una enfermedad vascular pulmonar que afecta a las arteriolas pulmonares que resultan en una elevación en la presión arterial pulmonar y resistencia vascular pulmonar, pero con presiones de llenado de los lados izquierdos normales o sólo ligeramente elevados. La PAH es provocada por una constelación de enfermedades que afectan la vasculatura pulmonar. La PAH puede ser provocada por o asociada con trastornos vasculares del colágeno, tales como esclerosis sistémica (esclerodermia), enfermedad cardíaca congénita sin corregir, enfermedad hepática, hipertensión portal, infección por VIH, Hepatitis C, ciertas toxinas, esplenectomía, telangiectasia hemorrágica hereditaria, y anomalías genéticas primarias. En particular, se ha identificado una mutación en el receptor tipo 2 de proteína morfogenética ósea (un receptor de TGF- $\beta$ ) como una causa de la hipertensión pulmonar primaria familiar (PPH). Se estima que el 6% de los casos de PPH son familiares, y que el resto son "esporádicos". La incidencia de la PPH se estima en aproximadamente 1 caso por 1 millón de habitantes. Las causas secundarias de PAH tienen una incidencia mucho mayor. La firma patológica de PAH es la lesión plexiforme del pulmón que consiste en la proliferación de células endoteliales obliterantes y la hipertrofia de células del músculo liso vascular en pequeñas arteriolas pulmonares precapilares. La PAH es una enfermedad progresiva asociada con una alta mortalidad. Los pacientes con PAH pueden desarrollar insuficiencia del ventrículo derecho (RV). El grado de insuficiencia del RV predice el resultado. La ruta de JAK/STAT ha sido implicada recientemente en la fisiopatología de la PAH. Las JAK son quinasas que fosforilan un grupo de proteínas llamadas transducción de señales y activadores de transcripción o STATS. Cuando se fosforilan, las STAT dimerizan, translocan al núcleo y activan la expresión de genes que conducen a proliferación de células endoteliales y células del músculo liso, y provocan hipertrofia de los miocitos cardíacos. Existen tres isoformas diferentes de JAK: JAK1, JAK2, y JAK3. Otra proteína con alta homología a las JAK se designa Tyk2. Un cuerpo emergente de datos ha mostrado que la fosforilación de STAT3, un sustrato para JAK2, se aumenta en modelos animales de PAH. En el modelo de monocrotalino de rata, se aumentó la fosforilación del factor de transcripción STAT3 promitogénico. En este mismo estudio las células endoteliales arteriales pulmonares (PAEC) tratadas con monocrotalina desarrollaron hiperactivación de STAT3. Un agente o proteína promitogénica es un agente o proteína que induce o contribuye a la inducción de la proliferación celular. Por lo tanto, uno de los efectos de la inhibición de JAK2 es reducir la proliferación de células endoteliales u otras células, tales como células musculares lisas. Un efecto contemplado de un inhibidor de JAK2 es el de reducir la proliferación de células endoteliales u otras células que obstruyen el lumen arteriolar pulmonar. Al disminuir la proliferación obstructiva de las células, un inhibidor de JAK2 podría ser un tratamiento eficaz de la PAH.

Adicionalmente se indica el uso de inhibidores de la quinasa JAK para el tratamiento de enfermedades virales y enfermedades metabólicas.

Aunque los otros miembros de la familia JAK son expresados por esencialmente todos los tejidos, la expresión de JAK3 parece estar limitada a las células hematopoyéticas. Esto es consistente con su función esencial en la señalización a través de los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 por asociación no covalente de JAK3 con la cadena gamma común a estos receptores multicadena. Los hombres con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (XSCID) tienen defectos en el gen de la cadena gamma del receptor de citoquina común (gamma c) que codifica un componente compartido, esencial de los receptores de la interleuquina-2 (IL-2), IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. Un síndrome XSCID en el que se ha identificado pacientes con cualquiera de los niveles severamente mutados o reducidos de la proteína JAK3, lo que sugiere que la inmunosupresión debería resultar de bloquear la señalización a través de la ruta de JAK3. Los estudios de genes inactivados en ratones han sugerido que JAK3 no sólo cumple una función crítica en la maduración de los linfocitos B y T, sino que la JAK3 es constitutivamente necesaria para mantener la función de las células T. Tomada junto con la evidencia bioquímica de la implicación de JAK3 en la dirección 3' de eventos de señalización del receptor IL-2 e IL-4, estos estudios de mutación humanas y de ratón

sugieren que la modulación de la actividad inmunitaria a través de la inhibición de JAK3 podría resultar útil en el tratamiento de trastornos proliferativos de células T y células B tales como el rechazo de trasplantes y enfermedades autoinmunitarias.

5 Aunque la inhibición de diversos tipos de proteínas quinasas, dirigidas a un rango de estados de enfermedad, es claramente beneficiosa, se ha demostrado hasta la fecha que la identificación de un compuesto que sea selectivo para una proteína quinasa de interés, y tenga buenas propiedades "similares a fármaco" tales como alta biodisponibilidad oral, es un objetivo difícil. Adicionalmente, está bien establecido que la previsibilidad o selectividad de inhibición en el desarrollo de inhibidores de quinasa es bastante baja, independientemente de la similitud de secuencia de nivel entre las enzimas que son objetivo.

10 La JAK1, en combinación con JAK2 está implicada en la transducción de señales en dirección 3' de los receptores IL-6, IL-11 e IFN- $\gamma$  entre otros. La JAK1, en combinación con JAK3, es esencial para la transducción de señales en dirección 3' de los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, entre otros. La JAK1, en combinación con TYK2, es responsable de la transducción de señales en dirección 3' de los receptores IL-10, IL-22 y IFN- $\alpha$  entre otros. TYK2 está implicado en la transducción de señales en dirección 3' de los receptores IL-12 e IL-23, entre otros. La producción de IFN $\gamma$  por las células T, mediadas por señalización de IL-12, es altamente dependiente de TYK2. Estas citoquinas y receptores están implicados en las respuestas pro-inflamatorias asociadas con enfermedades inmunológicas. Por lo tanto, la inhibición de la JAK1 tiene potencial para el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis y enfermedad de Crohn.

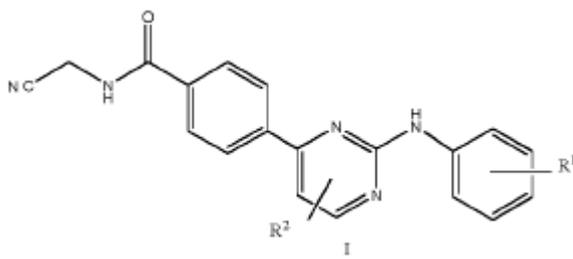
20 Los retos en el desarrollo de inhibidores de JAK terapéuticamente apropiados para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinasa tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares que incluyen diseñar un compuesto con especificidad apropiada que también tiene buena semejanza a fármaco.

25 Por lo tanto, subsiste una continua necesidad de diseñar y/o identificar los compuestos que inhiben específicamente la familia de quinasas JAK, y particularmente compuestos que son activos contra quinasas JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Subsiste la necesidad de dichos compuestos para el tratamiento de un rango de enfermedades.

El documento WO2009103032 divulga compuestos y procedimientos para utilizar los compuestos en el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con la actividad de JAK2.

#### Resumen

30 En un primer aspecto, se proporciona un compuesto de la fórmula I



en la que

R<sup>1</sup> es un heterociclilo bicíclico sustituido o no sustituido, en el que el heterociclilo bicíclico tiene dos anillos conectados que contienen por lo menos un heteroátomo y que es un anillo bicíclico no aromático;

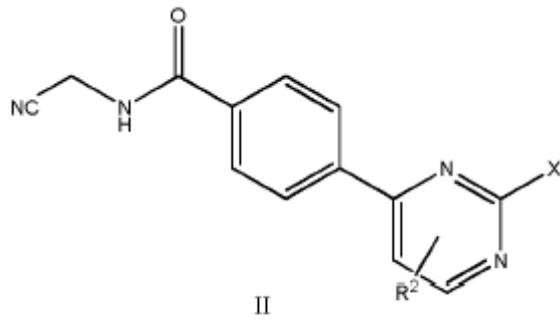
35 R<sup>2</sup> se selecciona de H, halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido, alcoxi C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido con CF<sub>3</sub>, CON(R)<sub>2</sub>, CN y CO<sub>2</sub>R;

R se selecciona de H y alquilo C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido,

o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En un segundo aspecto, se proporciona un proceso para la preparación del compuesto de la fórmula I como se definió anteriormente que comprende

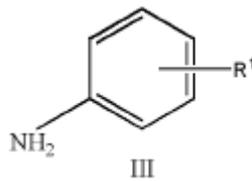
(i) acoplar un compuesto de la fórmula II



en la que

R<sup>2</sup> es como se definió anteriormente y X es un grupo saliente,

con un compuesto de la fórmula III

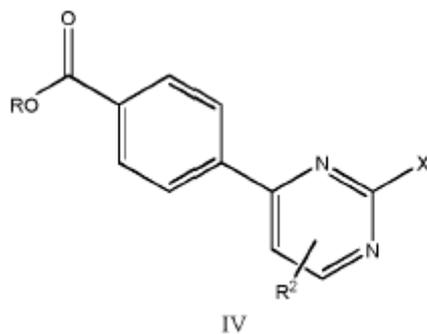


5

en la que

R<sup>1</sup> es como se definió anteriormente; o

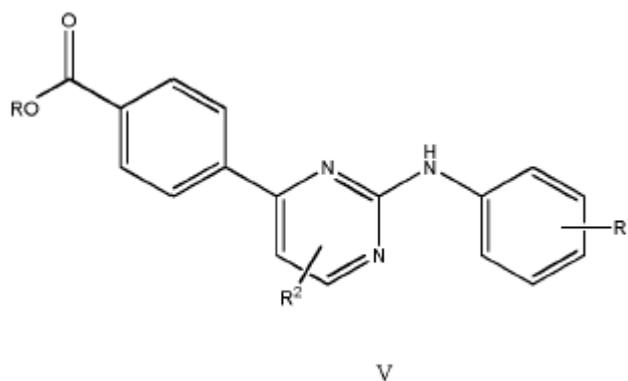
(ii) acoplar un compuesto de la fórmula IV



10 en la que

R<sup>2</sup>, X y R son como se definieron anteriormente,

con un compuesto de la fórmula III como se definió anteriormente para preparar un compuesto de la fórmula V



en la que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R son como se definieron anteriormente; y

acoplar el compuesto de la fórmula V como se definió anteriormente con



5 También se divulga el compuesto de la fórmula V definido anteriormente.

Los compuestos de la fórmula I son inhibidores de quinasa, es decir inhibidores de JAK, preferiblemente inhibidores de quinasa JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Estos compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinazinas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

10 En un cuarto aspecto, se proporciona un agente farmacéutico que comprende el compuesto de la fórmula I definido anteriormente.

También se proporciona el uso del compuesto de la fórmula I como un agente farmacéutico.

15 Se proporciona adicionalmente el compuesto de la fórmula I como se definió anteriormente para uso como un agente farmacéutico.

En un quinto aspecto, se proporciona un inhibidor de quinasa que comprende el compuesto de la fórmula I definido anteriormente.

Se proporciona adicionalmente el compuesto de la fórmula I como se definió anteriormente para uso como un inhibidor de quinasa.

20 En un sexto aspecto, se proporciona un compuesto de la fórmula 1 como se definió anteriormente para uso como un agente farmacéutico.

El compuesto de la fórmula I también se puede administrar en la forma de una composición farmacéutica junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

25 en un séptimo aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la fórmula I como se definió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica también comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.

30 El compuesto de la fórmula I puede estar contenido dentro o adherido a un implante, tal como un estent liberador de fármaco. Por ejemplo, cuando el compuesto se utiliza para el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar (PAH), el compuesto puede estar contenido dentro o adherido a un estent de la arteria pulmonar, que puede actuar localmente, o liberarse del estent en la circulación pulmonar donde el compuesto ejerce su actividad terapéutica en la vasculatura pulmonar.

En un octavo aspecto, se proporciona un implante que comprende el compuesto de la fórmula I definido anteriormente.

35 También se divulga un método para el tratamiento de enfermedades asociadas a quinazinas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares que comprende administrar una cantidad efectiva del compuesto de la fórmula I o una composición farmacéutica como se definió anteriormente a un sujeto en necesidad del mismo.

40 También se proporciona el uso del compuesto de la fórmula I o una composición farmacéutica como se definió anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a quinazinas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

45 También se divulga el uso del compuesto de la fórmula I o una composición farmacéutica como se definió anteriormente en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinazinas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

En un noveno aspecto, se proporciona el compuesto de la fórmula I o una composición farmacéutica como se definió anteriormente para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinasas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

- 5 También se divulga un método o para inhibir una quinasa en una célula que comprende poner en contacto la célula con el compuesto de la fórmula I definido anteriormente.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos de las quinasas JAK seleccionadas. Las secuencias mostradas son J2H = JAK2 (SEC. ID. NO. 1), jlh = JAK1 (SEC. ID. NO. 2), j3h = JAK3 (SEC. ID. NO. 3), y Tyk2 = TYK2 (SEC. ID. NO. 4). Las secuencias se numeran con la posición 1 a partir de aminoácido 833 de la secuencia de JAK2 (tomado de secuencia de Genbank NP\_004963) y los extremos en el aminoácido de terminal C. Las secuencias mostradas corresponden al dominio de quinasa de C.

La figura 2 es una gráfica que muestra los datos de IC50 (nM) para los compuestos 1 a 10.

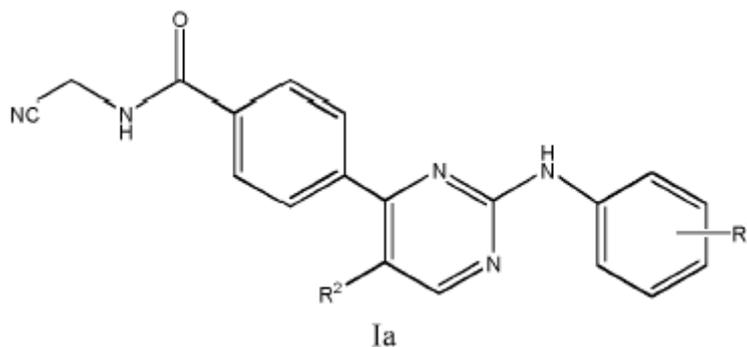
Descripción detallada

- 15 La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula I que inhiben las quinasas, que incluyen quinasas JAK tales como JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinasas tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

- 20 Compuestos

La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula I.

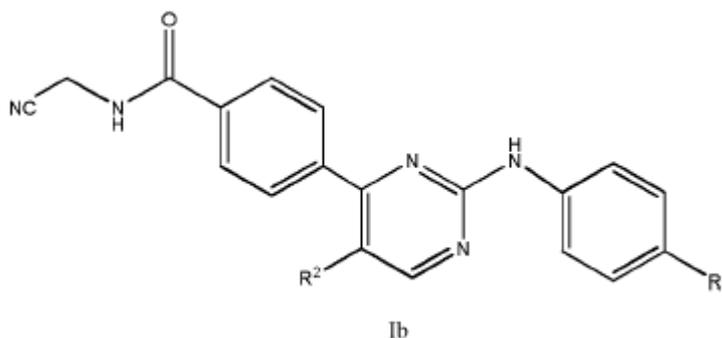
En una realización, el compuesto de la fórmula I tiene la fórmula Ia:



en la que

- 25 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se definieron anteriormente, o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el compuesto de la fórmula Ia tiene la fórmula Ib:



en la que

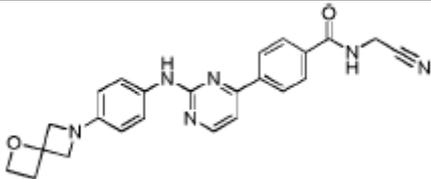
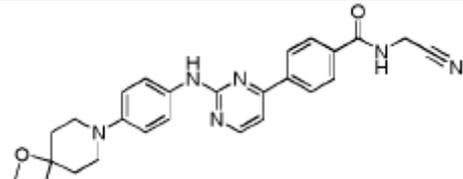
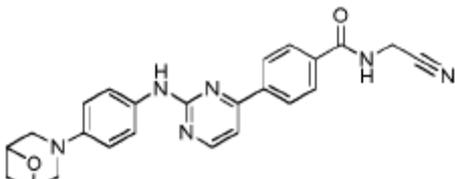
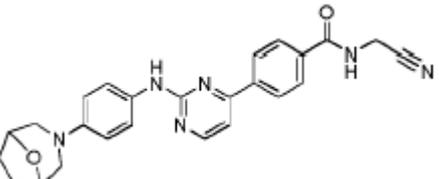
R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se definieron anteriormente,

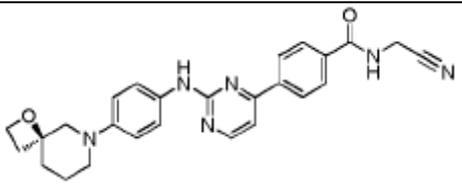
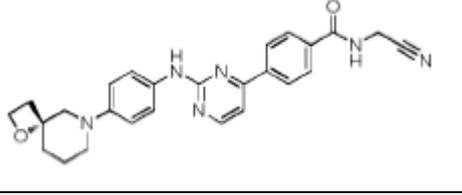
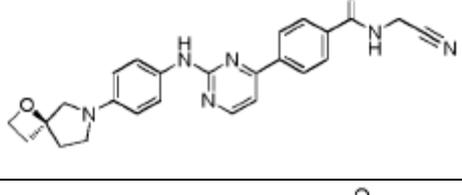
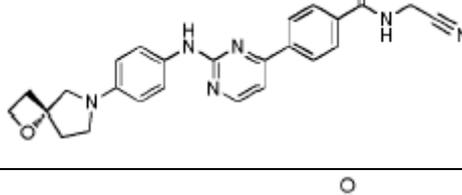
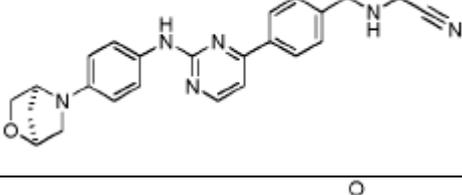
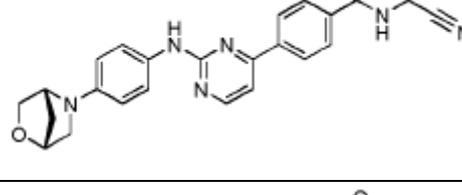
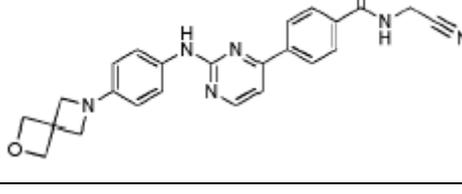
o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, R<sup>1</sup> es un heterociclilo bicíclico o espirocíclico fusionado o puentado saturado de 6 a 12 miembros que contiene por lo menos un heteroátomo seleccionado de N, O y/o S, preferiblemente N en un anillo y O en el otro anillo. Cada anillo del heterociclilo bicíclico puede tener 4-6 miembros con el heterociclilo que contiene N que incluye azetidina, pirrolidina y piperidina y el heterociclilo que contiene O que incluye oxetano, oxolano, (tetrahidrofurano) y dihidropirano o pirano. El átomo de N en el heterociclilo que contiene N preferiblemente se adhiere al anillo fenilo de la fórmula I o la. Ejemplos de heterociclilos bicíclicos fusionados saturados que contienen N y O de 6 a 12 miembros incluyen 6-oxa-3-azabicyclo[3.2.0]heptano, hexahidro-2H-furo[2,3-c]pirrol y 8-oxa-3-azabicyclo[4.2.0]octano. Ejemplos de heterociclilos bicíclicos puentados saturados que contienen N y O de 6 a 12 miembros incluyen 6-oxa-3-aza-bicyclo [3.1.1] heptano, 8-oxa-3-azabicyclo [3.2.1] octano, 2-oxa-5-azabicyclo [2.2.1] heptano, 3-oxa-8-azabicyclo[3.2.1]octano y 3-oxa-6-azabicyclo[3.1.1]heptano. Ejemplos de heterociclilos espirocíclicos saturados que contienen N y O de 6 a 12 miembros incluyen 1-oxa-6-azaespiro [3.3] heptano, 2-oxa-6-azaespiro [3.3] heptano, 1-oxa-6-ozaspiro [3.3] heptano, 1-oxa-6-azaespiro [3.4] octano, 1-oxa-6-azapiro [3.5] nonano y 1-oxa-7-azaespiro [3.5] nonano.

En una realización, R<sup>2</sup> es H, metil Cl, Br o F, preferiblemente H o metilo. Ejemplos de compuestos de la fórmula I o la incluye, pero no se limitan a, los siguientes:

Tabla 1

Número del compuesto	Estructura	Nombre
1		4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.3]heptan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
2		4-(2-((4-(1-oxa-7-azaespiro[3.5]nonan-7-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
3		4-(2-((4-(6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan-3-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
4		4-(2-((4-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida

5		(S)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.5]nonan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
6		(R)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.5]nonan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
7		(S)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.4]octan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
8		(R)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.4]octan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
9		4-(2-((4-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
10		4-(2-((4-((1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida
11		4-(2-((4-(2-oxa-6-azaespiro[3.3]heptan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida

El término "alquilo C1-4" se refiere a grupos de hidrocarburo de cadena lineal o de cadena ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos incluyen etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo y tert-butilo.

5 El término "alcoxi C<sub>1-4</sub>" se refiere a grupos que contienen oxígeno de cadena lineal o ramificada que tienen porciones alquilo de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y tert-butoxi.

El término "heterociclilo bicíclico" se refiere a compuestos que tienen dos anillos conectados que contienen por lo menos un heteroátomo. La conexión de los anillos se puede producir a través de un enlace entre dos átomos adyacentes (heterociclilo bicíclico fusionado), a través de una secuencia de átomos (heterociclilo bicíclico puenteado) o en un solo átomo (heterociclilo espirocíclico).

El heterociclilo bicíclico es un anillo bicíclico no aromático que puede estar saturado o contiene una o más unidades de insaturación. El anillo bicíclico puede contener 6 a 12 átomos en el anillo en los que uno o más carbonos en el anillo se reemplazan por un heteroátomo tal como N, S y/u O, por ejemplo, N y/u O.

Los átomos de C, N y S se pueden oxidar opcionalmente y los átomos de N se pueden cuaternizar opcionalmente.

- 5 Ejemplos incluyen sistemas heterociclilo biciclo [4-6, 4-6] tales como sistemas heterociclilo biciclo [4,4], [4,5], [5,4], [5,6], [6,4], [6,5] o [6,6].

10 Heterociclilos que contienen N de 4-6 miembros adecuados incluyen aquellos que contienen un átomo de N, tal como azetidina (anillo de 4 miembros); pirrolidina (tetrahidropirrol), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (anillos de 5 miembros); y piperidina, dihidropiridina o tetrahidropiridina (anillos de 6 miembros); o aquellos que contienen dos átomos de N, tales como imidazolina, pirazolidina (diazolidina), imidazolina o pirazolina (dihidropirazol) (anillos de 5 miembros) y piperazina (anillo de 6 miembros).

15 Heterociclilos que contienen O de 4-6 miembros adecuados incluyen aquellos que contienen un átomo de O tal como oxetano (anillo de 4 miembros); oxolano (tetrahidrofurano) o oxol (dihidrofurano) (anillos de 5 miembros); y oxano (tetrahidropirano), dihidropirano o pirano (anillos de 6 miembros); aquellos que contienen dos átomos de O, tales como dioxolano (anillo de 5 miembros) y dioxano (anillo de 6 miembros); o aquellos que contienen tres átomos de O, tales como trioxano (anillo de 6 miembros).

20 Heterociclilos que contienen S de 4-6 miembros adecuados incluyen aquellos que un átomo de S, tales como tietano (anillo de 4 miembros); tiolano (tetrahidrotiofeno) (anillo de 5 miembros); y tiano (tetrahidrotiopirano) (anillo de 6 miembros).

Heterociclilos que contienen N y O de 4-6 miembros adecuados incluyen aquellos que contienen uno átomo de N y uno de O tal como tetrahidrooxazol, dihidrooxazol, tetrahidroisoxazol o dihidroisoxazol (anillos de 5 miembros); y morfolina, tetrahidrooxazina, dihidrooxazina o oxazina (anillos de 6 miembros); o aquellos que contienen dos átomos de N y un átomo de O tal como oxadiazina (anillo de 6 miembros).

- 25 Heterociclilos que contienen N y S de 4-6 miembros adecuados incluyen incluyen tiazolina, tiazolidina (anillos de 5 miembros); y tiomorfolina (anillos de 6 miembros).

Heterociclilos que contienen O y S de 4-6 miembros adecuados incluyen oxatiol (anillo de 5 miembros); y oxatiano (tioxano) (anillo de 6 miembros).

Heterociclilos que contienen N, O y S de 4-6 miembros adecuados incluyen oxatiazina (anillo de 6 miembros).

- 30 En una realización, el heterociclilo bicíclico contiene N en un anillo y O en el otro anillo.

El sistema de anillos que contiene N puede tener de 4-6 miembros y preferiblemente es saturado y unido directamente al anillo de fenilo adecuadamente mediante el átomo de N. Ejemplos de heterociclilos saturados que contienen N de 4-6 miembros incluyen azetidina, pirrolidina y piperidina.

35 El sistema de anillos que contiene O puede tener 4-6 miembros y está saturado y unido al anillo que contiene N a través de un enlace entre dos átomos de carbono para formar un grupo heterociclilo bicíclico fusionado que contiene N y O bicíclico saturado de 6-12 miembros; a través de una secuencia de 3-4 o 3-5 átomos de carbono (incluyendo los átomos de unión del anillo) opcionalmente sustituido por uno o más átomos de O para formar un heterociclilo bicíclico puenteado que contiene N y O saturado de 6-12 miembros; o en un solo átomo de carbono para formar un heterociclilo espirocíclico que contiene N y O saturado de 6-12 miembros. Ejemplos de heterociclilos que contienen O saturados de 4-6 miembros incluyen oxetano, oxolano (tetrahidrofurano) y dihidropirano o pirano.

40 Heterociclilos bicíclicos fusionados que contienen N y O saturados de 6-12 miembros adecuados incluyen aquellos que contienen los heterociclilos que contienen N y O que contienen N y O saturados de 4-6 miembros descritos anteriormente tales como sistemas biciclo [5,4], por ejemplo 6-oxa-3-azabiciclo [3.2.0] heptano; sistemas biciclo [5,5], por ejemplo hexahidro-2H-furo [2,3-c]pirrol; y sistemas biciclo [6,4], por ejemplo 8-oxa-3-azabiciclo [4.2.0]octano.

45 Heterociclilos bicíclicos puenteados que contienen N y O saturados de 6-12 miembros adecuados incluyen sistemas biciclo [6,4] por ejemplo 6-oxa-3-azabiciclo [3.1.1] heptano; sistemas biciclo [6,5] por ejemplo 8-oxa-3-azabiciclo [3.2.1] octano; sistemas biciclo [5,5], por ejemplo, 2-oxa-5-azabiciclo [2.2.1] heptano; y sistemas biciclo [5,6] por ejemplo 3-oxa-8-azabiciclo [3.2.1] octano.

50 Heterociclilos bicíclicos espirocíclicos que contienen N y O saturados de 6-12 miembros adecuados incluyen sistemas biciclo [4,4], por ejemplo, 1-oxa-6-azaespiro [3,3] heptano, 2-oxa-6-azaespiro[3,3]heptano y 1-oxa-6-azaespiro [3,3] heptano; sistemas biciclo [5,4], por ejemplo, 1-oxa-6-azaespiro [3,4] octano; y sistemas biciclo [6,4], por ejemplo, 1-oxa-6-azaespiro[3,5]nonano y 1-oxa-7-azaespiro[3,5] nonano.

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "sustituido" se refiere a un grupo que se sustituye con uno o más grupos seleccionados de alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilarilo C<sub>1-6</sub>, arilo, halo, haloalquilo C<sub>1-6</sub>, halocicloalquilo C<sub>3-6</sub>, haloalqueno C<sub>2-6</sub>, haloalquino C<sub>2-6</sub>, haloarilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alquenoilo C<sub>2-6</sub>, alquinoilo C<sub>2-6</sub>, arilo, carboxilo, haloalcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquenoilo C<sub>2-6</sub>, haloalquinoilo C<sub>2-6</sub>, haloarilo, oxo, nitro, nitroalquilo C<sub>1-6</sub>, nitroalqueno C<sub>2-6</sub>, nitroarilo, azido, amino, alquilamino C<sub>1-6</sub>, alquenoilamino C<sub>2-6</sub>, alquinoilamino C<sub>2-6</sub>, arilamino, alquilalco C<sub>1-6</sub>, alquenoilalco C<sub>2-6</sub>, alquinoilalco C<sub>2-6</sub>, arilalco, acilamino, aciloxi, aldehído, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilo, alquilsulfonilamino C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilo, alquilsulfenilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfenilo, carboalcoxi, carboarilo, mercapto, alquiltio C<sub>1-6</sub>, ariltio, aciltio, y ciano. Los sustituyentes preferidos se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilarilo C<sub>1-6</sub>, arilo, halo, oxo, haloarilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub>, arilo, carboxilo, amino, alquilalco C<sub>1-6</sub>, arilalco, acilamino, aciloxi, alquilsulfenilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonil y ciano.

Los compuestos de la invención también se pueden preparar en forma de sales que son farmacéuticamente aceptables, pero se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también caen dentro del alcance de la presente invención, ya que éstas son útiles como intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, múico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, isetiónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico, valérico y ácidos orótico. Las sales de grupos amina también pueden comprender sales de amonio cuaternario en el que el átomo de nitrógeno amino lleva un grupo orgánico adecuado tal como un grupo funcional alquilo, alqueno, alquino o aralquilo.

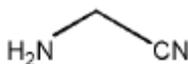
Las sales se pueden formar por medios convencionales, tal como al hacer reaccionar la forma de base libre del compuesto con uno o más equivalentes del ácido apropiado en un solvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un solvente tal como agua que se elimina a vacío o por liofilización o por intercambio de aniones de una sal existente por otro anión sobre una resina de intercambio iónico adecuada.

Cuando un compuesto posee un centro quiral, el compuesto se puede utilizar como un enantiómero purificado o diastereómero, o como una mezcla de cualquier relación de estereoisómeros. Sin embargo, se prefiere que la mezcla comprenda por lo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5% o 99% del isómero preferido, donde el isómero preferido da el nivel deseado de potencia y selectividad.

Esta divulgación también abarca profármacos de los compuestos de fórmula I. La divulgación también abarca métodos de tratamiento de trastornos que se pueden tratar mediante la inhibición de proteína quinasas, tales como JAK que comprende administrar fármacos o profármacos de los compuestos de la invención. Por ejemplo, los compuestos de fórmula I que tienen grupos amino, amido, hidroxilo o ácido carboxílico se pueden convertir en profármacos. Los profármacos incluyen compuestos en los que un residuo de aminoácido, o una cadena de polipéptidos de dos o más (por ejemplo, dos, tres o cuatro) residuos de aminoácidos que están unidos covalentemente a través de enlaces peptídicos a grupos amino, hidroxilo y grupos de ácido carboxílico de compuestos de la invención. Los residuos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos de origen natural comúnmente designados por símbolos de tres letras y también incluyen, 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, demosina, isodemosina, 3-metilhistidina, norvalina, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, citrulina, homocisteína, homoserina, ornitina y metioina sulfona. Los profármacos también incluyen compuestos en los que los carbonatos, carbamatos, amidas y ésteres de alquilo se unen covalentemente a los sustituyentes anteriores de los compuestos de la presente invención a través de la cadena lateral de profármaco de carbono carbonilo. Los profármacos también incluyen derivados de fosfato de compuestos (tales como ácidos, sales de ácidos o ésteres) unidos a través de un enlace fósforo-oxígeno a un hidroxilo libre de los compuestos de fórmula I. Los profármacos también pueden incluir N-óxidos y S-óxidos de átomos de nitrógeno y de azufre apropiados en la fórmula I.

#### Procesos

Los compuestos de la fórmula general I se preparan al acoplar el compuesto de la fórmula II o IV con el compuesto de la fórmula III. Cuando el compuesto de la fórmula IV se utiliza, entonces se prepara el compuesto de la fórmula V que luego se acopla con



para preparar los compuestos de la fórmula I.

El compuesto de fórmula II o IV se puede preparar generalmente por una reacción de acoplamiento cruzado entre una 2,4-dicloropirimidina y un socio de acoplamiento adecuadamente funcionalizado. Alternativamente la dicloropirimidina se puede convertir en un diiodopirimidina, que luego se acopla con un socio de acoplamiento

adecuadamente funcionalizado. Los socios de acoplamiento típicos son los ácidos organoborónicos o ésteres (acoplamiento de Suzuki: véase por ejemplo Miyaura, N. and Suzuki, *Chem Rev.* 1995, 95 2457), organoestannanos (acoplamiento de Stille: véase, por ejemplo, S Stille, J.K., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 508), reactivos de Grignard (acoplamiento de Kumada: Kumada, M.; Tamao, K.; Sumitani, K. *Org. Synth.* 1988, Coll. Vol.6, 407.) o especies de organozinc (acoplamiento de Negishi: Negishi, E.; *J. Organomet. Chem.* 2002, 653, 34). El acoplamiento de Suzuki es el método de acoplamiento preferido y se realiza normalmente en un solvente tal como DME, THF, DMF, etanol, propanol, tolueno, acetonitrilo o 1,4-dioxano, con o sin agua agregada, en presencia de una base tal como carbonato de sodio o potasio, hidróxido de litio, carbonato de cesio, hidróxido de sodio, fluoruro de potasio o fosfato de potasio. La reacción se puede llevar a cabo a temperaturas elevadas y el catalizador de paladio empleado se puede seleccionar a partir de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, [PdCl<sub>2</sub>(dppf)], Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/P(t-Bu)<sub>3</sub>.

La segunda etapa del proceso implica una reacción de sustitución aromática nucleófila del compuesto de fórmula II o IV con una anilina adecuadamente sustituida. La sustitución aromática nucleófila se lleva a cabo normalmente mediante la adición de la anilina al intermedio heterocíclico monohalo obtenido de la primera reacción en un solvente tal como etanol, n/propanol, isopropanol, tert-butanol, dioxano, THF, DMF, tolueno o xileno. La reacción se realiza normalmente a temperatura elevada en presencia de un ácido tal como HCl o ácido p-toluenosulfónico o en presencia de una base tal como una base no nucleófila tal como trietilamina o diisopropilietilamina, o una base inorgánica tal como carbonato de potasio o carbonato de sodio.

Alternativamente, el sustituyente anilina se puede introducir a través de una reacción de aminación catalizada por metal de transición. Los catalizadores típicos para tales transformaciones incluyen Pd(OAc)<sub>2</sub>/P(t-Bu)<sub>3</sub>, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>/BINAP y Pd(OAc)<sub>2</sub>/BINAP. Estas reacciones se llevan a cabo normalmente en solventes tales como tolueno o dioxano, en presencia de bases tales como carbonato de cesio o sodio o tert-butoxido de potasio a temperaturas que varían desde temperatura ambiente hasta reflujo (por ejemplo, Hartwig, J.F., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, 2046).

Las anilinas empleadas en la primera etapa de la síntesis de estos compuestos se pueden sintetizar a través de la adición de amino cíclico a 1-fluoro-4-nitro-anilina y reducción posterior del grupo nitro utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los productos formados a partir de cualquiera de las etapas de reacción se pueden derivar adicionalmente utilizando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Alternativamente, la derivación del intermedio mono-halo se puede llevar a cabo antes del desplazamiento del sustituyente halo. Los expertos en la técnica apreciarán que el orden de las reacciones descritas para las síntesis anteriores se puede cambiar en determinadas circunstancias y que ciertas funcionalidades pueden necesitar ser derivadas (es decir, protegidas) en ciertos casos para las reacciones descritas anteriormente o proceder con un rendimiento y eficiencia razonable. Los tipos de protección de funcionalidad son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y se describen por ejemplo en Greene (Greene, T., Wuts, P. (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley-Interscience; 3rd edition.).

El grupo saliente en el compuesto de fórmula II o IV que es un intermedio utilizado en el proceso de la presente invención puede ser cualquier tipo conocido adecuado, tal como aquellos descritos en J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure" 4th Edition, pp 352-357, John Wiley & Sons, New York, 1992. Preferiblemente, el grupo saliente es un halógeno, más preferiblemente cloro o yodo.

#### Inhibición de JAK

Los compuestos de fórmula I tienen actividad contra las proteínas quinasas, que incluyen las quinasas JAK y más particularmente son activos contra JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Un inhibidor de JAK2 es cualquier compuesto que inhibe selectivamente la actividad de JAK2. Una actividad de JAK2 es fosforilar una proteína STAT. Por lo tanto, un ejemplo de un efecto de un inhibidor de JAK2 es disminuir la fosforilación de una o más proteínas STAT. El inhibidor puede inhibir la forma fosforilada de JAK2 o la forma no fosforilada de JAK2.

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de fórmula I como inhibidores de la quinasa tales como inhibidores de quinasa JAK, en particular inhibidores de JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2.

#### Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos uno de los compuestos de la fórmula I y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" lo que significa que es compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para un sujeto. Las composiciones de la presente invención pueden contener otros agentes terapéuticos como se describe a continuación, y se pueden formular, por ejemplo, al emplear vehículos sólidos o líquidos convencionales o diluyentes, así como aditivos farmacéuticos de un tipo apropiado para el modo de administración deseada (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizantes, sabores, etc.) de acuerdo con técnicas tales como aquellas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica (Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., 2005, Lippincott Williams & Wilkins).

Los compuestos de la invención se pueden administrar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos o polvos; por vía sublingual; bucal; parenteral, tal como por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra(trans) dérmica, o técnicas de inyección o infusión intracisternal (por ejemplo, inyectable estéril acuosa o como soluciones o suspensiones no acuosas); por vía nasal tal como mediante pulverizador de inhalación o insuflación; vía tópica, tal como en la forma de una crema o unguento ocular, en la forma de una solución o suspensión; por vía vaginal en forma de pesarios, tampones o cremas; o por vía rectal tal como en forma de supositorios; en formulaciones de dosificación unitarias que contienen vehículos no tóxicos, o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos se pueden, por ejemplo, administrar en una forma adecuada para liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o liberación prolongada se puede conseguir mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los presentes compuestos, o, particularmente en el caso de la liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de la invención se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Estos métodos generalmente incluyen la etapa de poner el compuesto de fórmula I en asociación con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan al asociar uniforme e íntimamente el compuesto de fórmula I en asociación con un portador líquido o un portador sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el compuesto objeto activo se incluye en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o estado de las enfermedades. Como se utiliza aquí, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de fórmula I puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, por ejemplo, para proporcionar preparaciones farmacéuticamente estables y de sabor agradable. Los comprimidos contienen el compuesto de fórmula I en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para liberación controlada.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas duras de gelatina en las que el compuesto de fórmula I se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el compuesto de fórmula I se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, povidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o condensación productos de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tales como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilen sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas se pueden formular al suspender el compuesto de fórmula I en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes tales como aquellos expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes se pueden agregar para proporcionar una preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

- 5 Los polvos dispersables y gránulos adecuados para preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el compuesto de fórmula I en mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y de suspensión se ejemplifican por aquellos ya mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, edulcorantes, aromatizantes y agentes colorantes.
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma de acacia o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo, soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.
- 15 Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes.
- 20 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente parenteralmente aceptable no tóxico o solvente, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Adicionalmente, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio solvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando se puede emplear incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de formulaciones inyectables.
- 25 Para la administración al tracto respiratorio, que incluye la administración intranasal, el compuesto activo se puede administrar por cualquiera de los métodos y formulaciones empleadas en la técnica para la administración al tracto respiratorio.
- 30 Por lo tanto, en general, el compuesto activo se puede administrar en forma de una solución o una suspensión o como un polvo seco.
- 35 Las soluciones y suspensiones serán generalmente acuosas, por ejemplo, preparadas a partir de solo agua (por ejemplo agua estéril o libre de pirógenos) o agua y un cosolvente fisiológicamente aceptable (por ejemplo etanol, propilenglicol o polietilenglicoles tales como PEG 400).
- 40 Dichas soluciones o suspensiones pueden contener adicionalmente otros excipientes por ejemplo conservantes (tales como cloruro de benzalconio), agentes solubilizantes/surfactantes tales como polisorbatos (por ejemplo, Tween 80, Span 80, cloruro de benzalconio), agentes reguladores, agentes de isotonicidad de ajuste (por ejemplo, cloruro de sodio), potenciadores de absorción y potenciadores de viscosidad. Las suspensiones pueden contener adicionalmente agentes de suspensión (por ejemplo, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio).
- 45 Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo, con un cuentagotas, pipeta o pulverizador. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma única o multidosis. En el último caso deseablemente se proporciona un medio de medición de dosis. En el caso de un cuentagotas o pipeta esto se puede conseguir por el sujeto administrando un volumen predeterminado apropiado de la solución o suspensión. En el caso de un pulverizador esto se puede lograr por ejemplo por medio de una bomba dosificadora de pulverización de atomización.
- 50 La administración también se puede lograr por medio de una formulación en aerosol en la que el compuesto se proporciona en un empaque presurizado con un propelente adecuado, al tracto respiratorio tal como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un surfactante tal como lecitina. La dosis de compuesto activo se puede controlar mediante la provisión de una válvula dosificadora.
- 55 Alternativamente, el compuesto activo se puede proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla de polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetil celulosa y polivinilpirrolidina (PVP). Convenientemente, el portador en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina, o empaques blíster a partir del cual el polvo se puede administrar por medio de un inhalador.
- 55 En las formulaciones destinadas a administración al tracto respiratorio, que incluyen formulaciones intranasales, el compuesto activo tendrá generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 5 micras o

menos. Dicho tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante micronización.

Cuando se desee, se pueden emplear formulaciones adaptadas para proporcionar una liberación sostenida del compuesto activo.

- 5 El compuesto activo se puede administrar por inhalación oral como un polvo de flujo libre a través de un "Diskhaler" (marca registrada de Glaxo Group Ltd) o un inhalador de aerosol de dosis dosificada.

10 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar al mezclar el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y por tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las composiciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del ingrediente activo, dichos portadores que se conocen en la técnica por ser apropiados.

15 Para uso tópico, se emplean cremas, pomadas, jaleas, soluciones o suspensiones, etc., que contienen los compuestos de la presente invención. (Para los propósitos de esta solicitud, la aplicación tópica incluirá enjuagues bucales y gárgaras).

20 Para aplicación al ojo, el compuesto activo puede estar en la forma de una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. También se pueden incluir aditivos, por ejemplo, reguladores, conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas, tales como acetato o nitrato fenil mercúrico, cloruro de benzalconio, o clorhexidina y agentes espesantes tales como hipromelosa.

25 Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos mono- o multilamelares hidratados que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidil colinas, tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica.

30 La eficacia de esta clase de compuestos puede ser aplicable a estents liberadores de fármacos. Las aplicaciones potenciales a estents liberadores de fármacos con estos compuestos incluyen estenosis de la arteria pulmonar, estenosis de la vena pulmonar, así como estenosis de la arteria coronaria. Los estents liberadores de fármacos también se pueden utilizar en injertos de vena safena o injertos o conductos arteriales. Los estents liberadores de fármacos que liberan esta clase de compuestos también pueden ser aplicables para el tratamiento de estenosis de la aorta o arterias periféricas, tal como la arteria iliaca, la arteria femoral o la arteria poplítea. El compuesto se puede unir al estent liberador de fármaco mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos métodos incluyen polímeros, fosforil colina, y cerámicas. El compuesto también se puede impregnar en un estent bioabsorbible.

35 Los compuestos activos también se pueden presentar para uso en la forma de composiciones veterinarias, que se pueden preparar, por ejemplo, por métodos que son convencionales en la técnica. Ejemplos de dichas composiciones veterinarias incluyen aquellas adaptadas para:

40 (a) administración oral, aplicación externa, por ejemplo, soluciones orales (por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); comprimidos o bolos; polvos, gránulos o bolitas para mezcla con las materias de alimentación; pastas para aplicación a la lengua;

45 (b) administración parenteral por ejemplo por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ejemplo, como una solución o suspensión estéril; o (cuando sea apropiado) por inyección intramamaria donde se introduce una suspensión o disolución en la ubre a través de la mama;

(c) aplicaciones tópicas, por ejemplo, como una crema, ungüento o pulverizador aplicado a la piel; o

(d) por vía rectal o intravaginal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma.

50 La composición farmacéutica y el método de la presente invención pueden comprender además otros compuestos terapéuticamente activos como se ha señalado aquí que normalmente se aplican en el tratamiento de las condiciones patológicas mencionadas anteriormente. La selección de los agentes apropiados para su uso en terapia de combinación puede ser realizada por una persona medianamente experta en la técnica, de acuerdo con principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Utilizando este enfoque,

se puede ser capaz de lograr eficacia terapéutica con dosificaciones menores de cada agente, reduciendo de esta manera los potenciales efectos secundarios adversos.

Ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen los siguientes: antagonistas de los receptores de endotelina (por ejemplo, ambrisentan, bosentan, sitaxsentan), inhibidores de PDE-V (por ejemplo, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo), bloqueadores de los canales de calcio (por ejemplo, amlodipino, felodipino, vorepamil, diltiazem, mentol), prostaciclina, treprostinil, iloprost, beraprost, óxido nítrico, oxígeno, heparina, warfarina, diuréticos, digoxina, ciclosporinas (por ejemplo, ciclosporina A), CTLA4-Ig, anticuerpos tales como ICAM-3, receptor de anti-IL-2 (anti-Tac), anti-CD45RB, anti-CD2, anti-CD3 (OKT-3), anti-CD4, anti-CD80, anti-CD86, agentes que bloquean la interacción entre CD40 y gp39, tales como anticuerpos específicos para CD40 y/o gp39 (es decir, CD154), proteínas de fusión construidas a partir de CD40 y gp39 (CD401g y CD8gp39), inhibidores, tales como inhibidores nucleares de translocación, de función B NF-kappa, tales como desoxiespergualina (DSG), inhibidores de biosíntesis de colesterol tales como inhibidores de inhibidores de la HMG CoA reductasa (lovastatina y simvastatina), fármacos antiinflamatorios no esteroide (NSAID) tales como ibuprofeno, aspirina, acetaminofén, leflunomida, desoxiespergualina, inhibidores de ciclooxigenasa tales como celecoxib, esteroides tales como prednisolona o dexametasona, compuestos de oro, beta-agonistas tales como salbutamol, LABA tales como salmeterol, antagonistas de leucotrienos tales como montelukast, agentes antiproliferativos tales como metotrexato, FK506 (tacrolimus, Prograf), micofenolato mofetilo, fármacos citotóxicos tales como azatioprina, VP-16, etopósido, fludarabina, doxorribina, adriamicina, amsacrina, camptotecina, citarabina, gemcitabina, fluorodesoxiuridina, melfalán y ciclofosfamida, antimetabolitos tales como metotrexato, inhibidores de topoisomerasa tales como camptotecina, agentes alquilantes de ADN tales como cisplatino, inhibidores de quinasa tales como sorafenib, venenos de microtúbulos tales como paclitaxel, inhibidores de TNF- $\alpha$  tales como tenidap, anticuerpos anti-TNF o receptor de TNF soluble, urea hidroxilada y rapamicina (sirolimus o Rapamune) o derivados de los mismos.

Cuando se emplean otros agentes terapéuticos en combinación con los compuestos de la presente invención se pueden utilizar por ejemplo en cantidades como se indica en la Physician Desk Reference (PDR) o como se determina de otro modo por un experto medianamente versado en la técnica.

#### Métodos de tratamiento

Los compuestos de fórmula I se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades asociadas a quinasa que incluyen enfermedades asociadas a quinasa JAK tales como enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órganos; enfermedades hiperproliferativas, que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades virales; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

En general, el término "tratamiento" significa que afecta a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o efecto fisiológico deseado e incluyen: (a) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los efectos de la enfermedad.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal que tiene una enfermedad que requiere tratamiento con el compuesto de fórmula I.

Además de los primates, como los humanos, se puede tratar una variedad de otros mamíferos utilizando los compuestos, composiciones y métodos de la presente invención. Por ejemplo, mamíferos que incluyen, pero no se limitan a, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, cobayas, ratas se pueden tratar otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o especies murinas. Sin embargo, la invención también se puede practicar en otras especies, tales como especies aviares (por ejemplo, pollos).

Se debe entender que el término "administración" significa proporcionar un compuesto de la invención a un sujeto en necesidad de tratamiento.

El término "enfermedades asociadas a quinasa" se refiere a un trastorno o trastornos que se dan como resultado directo o indirecto de o se agravan por la actividad aberrante de la quinasa, en particular actividad de JAK y/o que se alivian mediante la inhibición de una o más de estas enzimas quinasa.

En una realización preferida, los estados de enfermedad asociados a quinasa implican una o más de las quinasas JAK, JAK1, JAK2, JAK3 o TYK2. En una realización particularmente preferida, la enfermedad implica quinasa JAK2. Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, aquellas enumeradas en la Tabla a continuación.

#### Activación de la ruta de JAK/STAT en diversas patologías

Tipo de enfermedad	Tipos de células implicadas	citoquinas implicadas	quinasa JAK implicada	Características
--------------------	-----------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------

Tipo de enfermedad	Tipos de células implicadas	citoquinas implicadas	quinasa JAK implicada	Características
Atopia asma alérgica, dermatitis atópica (eczema), rinitis alérgica,	mastocitos, eosinófilos, células T, células B,	IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13	JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	activación de células T, de células B, seguido por activación mediada por IgE de los mastocitos y eosinófilos residentes
CMI Dermatitis alérgica de contacto, neumonitis por hipersensibilidad	células T, células B, macrófagos, neutrófilos	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF, IL-7, IL-13,	JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	activación de células B y/o células T <sub>DH</sub> de macrófagos/activación de granulocitos
Enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias esclerosis múltiple, Glomerulonefritis lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, artritis juvenil, síndrome de Sjögren, esclerodermia polimiositis, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica	células B, células T, monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos,	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , TNF, GM-CSF; G-CSF,	JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	producción de citoquina (por ejemplo, TNF $\alpha/\beta$ , IL-1, CSF-1 de GM-CSF), activación de células T, activación de células B, activación de JAK/STAT
Trasplante rechazo de aloinjerto GvHD	células T, células B, macrófagos	IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-13, TNF	JAK1, JAK2, JAK3,	necrosis mediada por macrófagos/células T, apoptosis mediada por células Tc, y opsonización mediada por células B/Ig/necrosis de injerto extraño
Enfermedades virales		Citoquinas Virales, IL-2,	JAK1, JAK2, JAK3	Mediación de JAK/STAT
Virus de Epstein Barr (EBV)	linfocitos			
hepatitis B	hepatocitos			
hepatitis C	hepatocitos			
VIH	linfocitos			
HTLV 1	linfocitos			
virus varicela-zoster (VZV)	fibroblastos			
Virus de papiloma humano (HPV)	células epiteliales			
enfermedades hiperproliferativas -cáncer				
leucemia	Leucocitos	diversas citoquinas autocrinas, activación intrínseca	JAK1, JAK2, JAK3	producción de citoquinas, activación JAK/STAT
linfoma	linfocitos			
mieloma múltiple	diversos			
cáncer de próstata	diversos			
cáncer de mama	diversos			
linfoma de hodgkins	diversos			

Tipo de enfermedad	Tipos de células implicadas	citoquinas implicadas	quinasa JAK implicada	Características
leucemia linfocítica crónica de células B	diversos			
cáncer de pulmón	diversos			
hepatoma	diversos			
melanoma metastásico	diversos			
Glioma	diversos			
Enfermedades mieloproliferativas policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitemia, trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis idiopática, leucemia mielógena crónica, mastocitosis sistémica (SM), leucemia neutrofilica crónica (CNL), síndrome mielodisplásico (MDS), enfermedad de mastocitos sistémica (SMCD)	hematopoyéticas	interleuquina-3, eritropoyetina, trombopoyetina	mutación de JAK2	activación de JAK /STAT
Enfermedad Vascular hipertensión, hipertrofia, insuficiencia cardíaca, isquemia, hipertensión arterial pulmonar,	células endoteliales, células del músculo liso que incluyen células de la arteria pulmonar del músculo liso, miocitos cardiacos, fibroblastos, células endoteliales	IL6, angiotensina II, LIF, TNF-alfa, serotonina, caveolina-1,	JAK1 JAK2, TYK2	activación de JAK/STAT
Enfermedad metabólica obesidad, síndrome metabólico	adipocitos, células de pituitaria, neuronas, monolitos	leptina	JAK2	activación de JAK/STAT

5 El término “enfermedad inmunológica e inflamatoria” se refiere a una enfermedad inmunológica, inflamatoria o autoinmunitaria, que incluye pero no se limita a artritis reumatoide, poliartritis, espondilitis reumatoide, osteoartritis, gota, asma, bronquitis, rinitis alérgica, enfermedad obstructiva crónica pulmonar (COPD), fibrosis pulmonar, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino irritable, colitis mucosa, colitis ulcerosa, colitis diabrotica, enfermedad de Crohn, trastornos de la tiroides autoinmunes, gastritis, esofagitis, hepatitis, pancreatitis, nefritis, psoriasis, eczema, acné vulgaris, dermatitis, urticaria, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de nuerona motora (enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Paget, sepsis, conjuntivitis, catarro nasal, artrorreumatismo crónico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), polimiositis, dermatomiositis (DM), Polaritis nodosa (PN), polimialgia reumática, trastorno del tejido conjuntivo mixto (MCTD), síndrome de Sjogren, síndrome de Crouzon, acondroplasia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, vasculitis, displasia tanatofórica, resistencia a la insulina, diabetes de tipo I y complicaciones de diabetes y síndrome metabólico.

15 El término “enfermedades hiperproliferativas” incluye cáncer y estados de enfermedades mieloproliferativas tales como estados de enfermedad celular-proliferativa, que incluye pero no se limita a: Cardíaca: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma;

Pulmonar: carcinoma broncogénico (células epidermoides, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), alveolar (bronquiolar) carcinoma, adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hemangioma condromatoso, inosotelioma; Gastrointestinal: esófago (carcinoma de células epidermoides, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosos, hamartoma, leiomioma); del tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células epidermoides, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículo (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); del Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Óseas: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células reticulares), mieloma múltiple, cordoma de tumor celular maligno gigante, osteochondroma (exostosis osteocartilaginosas), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoide osteoma y tumores de células gigantes; del Sistema nervioso: craneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, deformación osteítis), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológicas: útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pre-tumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células granulosa-terales, tumores de células Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células epidermoides, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células epidermoides, sarcoma botriode [rhabdomyosarcoma embrional]), trompas de Falopio (carcinoma); Hematológicas: sangre (leucemia mielóide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin de [linfoma maligno]; de Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células epidermoides, sarcoma de Kaposi, lunares displásicos nevi, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; de Glándulas suprarrenales: neuroblastoma; y enfermedades Mieloproliferativas tales como policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria, trombocitemia, trombocitemia esencial (ET), agnónica metaplasia mielóide (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF), leucemia mielógena crónica (CML), mastocitosis sistémica (SM), leucemia crónica neutrofílica (CNL), leucemia mielomonocítica crónica (CMML), síndrome mielodisplásico (MDS) y enfermedad de mastocitos sistémica (SMCD).

El término “enfermedades vasculares” se refiere a enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipertrofia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, trastornos trombóticos, apoplejía, fenómeno de Raynaud, síndrome de POEMS, angina, isquemia, migraña, enfermedad arterial periférica, falla cardíaca, reestenosis, aterosclerosis, hipertrofia ventricular izquierda, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón, riñón, hígado y el cerebro, e hipertensión arterial pulmonar.

Las enfermedades preferidas para inhibidores de JAK2 incluyen enfermedades inmunológicas e inflamatorias tales como enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, dermatitis atópica, asma, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, síndrome de Crouzon, acondroplasia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, vasculitis, displasia tanatóforica y la diabetes; trastornos hiperproliferativos tales como cáncer por ejemplo cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de hígado tales como hepatoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tales como glioma, cáncer de piel tal como melanoma metastásico, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y enfermedades mieloproliferativas tales como policitemia vera (PV), mielofibrosis, trombocitemia, trombocitemia esencial (ET), metaplasia mielóide agnónica (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF) y leucemia mielógena crónica (CML); y enfermedades vasculares tales como la hipertensión, hipertrofia, apoplejía, fenómeno de Raynaud, síndrome de POEMS, angina, isquemia, migraña, enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardíaca, reestenosis, aterosclerosis e hipertensión arterial pulmonar.

Las enfermedades preferidas para los inhibidores de JAK1 y TYK2 incluyen enfermedades inmunológicas e inflamatorias tales como enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumática, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria del intestino. Los inhibidores de JAK1 también se pueden utilizar para tratar trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer, por ejemplo cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de hígado tales como hepatoma, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tales como glioma, cáncer de piel tales como melanoma metastásico, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y enfermedades mieloproliferativas tales como policitemia vera (PV), mielofibrosis, trombocitemia, trombocitemia esencial (ET), metaplasia mielóide agnónica (AMM), también denominada mielofibrosis idiopática (IMF) y leucemia mielógena crónica (CML).

Las enfermedades preferidas para los inhibidores de JAK3 son enfermedades inmunológicas e inflamatorias, que incluyen enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerodermia, esclerosis múltiple, neuritis autoinmune, artritis reumatoide, psoriasis, resistencia a la insulina, diabetes tipo I y complicaciones de la diabetes, síndrome metabólico, asma, dermatitis atópica, trastornos

autoinmunes de tiroides, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de Alzheimer, y otras indicaciones en las que la inmunosupresión puede ser deseable tal como trasplantes de órganos y enfermedad injerto contra anfitrión. Adicionalmente los inhibidores específicos de JAK3 pueden encontrar aplicación para los tratamientos terapéuticos para enfermedades hiperproliferativas tales como leucemia y linfoma donde se hiperactiva el JAK3.

## 5 Dosis

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de fórmula I y II que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo buscada por el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

En el tratamiento o prevención de afecciones que requieren inhibición de la quinasa un nivel de dosificación apropiado será generalmente aproximadamente 0.01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en una única o múltiples dosis. Preferiblemente, el nivel de dosificación será aproximadamente 0.1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferiblemente aproximadamente 0.5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser aproximadamente 0.01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente 0.05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente 0.1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este rango la dosificación puede ser 0.05 a 0.5, 0.5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para administración oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos que contienen 1.0 a 1000 miligramos del ingrediente activo, particularmente 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, y 1000.0 miligramos del ingrediente activo. La dosis se puede seleccionar, por ejemplo, para cualquier dosis dentro de cualquiera de estos rangos, para la eficacia terapéutica y/o ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Los compuestos se administrarán preferiblemente en un régimen de 1 a 4 veces por día, preferiblemente una o dos veces por día.

Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular se puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de acción de ese compuesto, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y la terapia a la que se somete el anfitrión.

En realizaciones, un compuesto de la presente invención es para uso en un método para el tratamiento de la "enfermedad mieloproliferativa" y "neoplasmas mieloproliferativos (MPN)" más notablemente la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (PMF). Un grupo de trabajo internacional para la investigación sobre neoplasma mieloproliferativo y tratamiento (GTI-MRT) se ha establecido para delimitar y definir estas afecciones (véase, por ejemplo, Vannucchi et al, CA Cancer J. Clin., 2009, 59:171-191), y aquellas definiciones de la enfermedad se aplicarán para los propósitos de esta especificación. Los sujetos "en riesgo de" una forma particular de la MPN son sujetos que tienen una forma de etapa temprana de la enfermedad, y puede incluir, por ejemplo, sujetos que tienen un marcador genético de los mismos, tales como el alelo JAK2V617F que se asocia con PV (>95%), con ET (60%) y con PMF (60%). Los sujetos también se consideran "en riesgo de" una forma de NMF si ellos ya manifiestan síntomas de una forma etapa anterior. Por lo tanto, los sujetos que presentan NMF están en riesgo de post-PV y post-ET, las cuales se desarrollan siguiendo MPN. Para el tratamiento de dichos sujetos, un compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de comprimidos en una dosis unitaria dentro del rango de 50 mg a 500 mg, que incluye en particular 150 mg o 300 mg, y a una frecuencia de dosificación de 1 a 4 veces al día, tal como una vez o dos veces al día. Dichos sujetos también se pueden tratar en combinación con otros fármacos útiles en el tratamiento de la afección en particular, que incluyen dichos fármacos como talidomida, lenalidomida, otros inhibidores de quinasa JAK2 o JAK1/2, hidroxiurea o anagrelida, o en combinación con bisfosfonatos para reducir la fibrosis de médula ósea. Adicionalmente, estos pacientes también se pueden someter a terapia de radiación o trasplante de médula ósea alogénica, como parte de la terapia general que incluye la dosificación con un compuesto presente.

En otra realización, un compuesto de la presente invención es para uso en un método para el tratamiento específicamente de síndrome mielodisplásico (MDS). El síndrome mielodisplásico (MDS) es un término utilizado para describir un grupo de enfermedades caracterizadas por la hematopoyesis ineficaz que conduce a citopenias de la sangre y la médula ósea hiperclonal. El MDS se ha considerado tradicionalmente como sinónimo de 'preleucemia' debido al mayor riesgo de transformación en leucemia mielógena aguda (AML). La evolución de la LMA y las consecuencias clínicas de citopenias son las principales causas de morbilidad y mortalidad en los MDS. Los síntomas debilitantes de MDS incluyen fatiga, palidez, infección y sangrado. La anemia, neutropenia y trombocitopenia son también manifestaciones clínicas comunes de MDS. Para el tratamiento de dichos sujetos, un compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de comprimidos en una dosis unitaria dentro del rango de 50 mg a 500 mg, que incluye en particular 150 mg o 300 mg, y a una frecuencia de dosificación de 1 a 4 veces al día, tal como una vez o dos veces al día.

En otras realizaciones, un compuesto de la presente invención es para uso en el método para el tratamiento de anemia, incluyendo anemia asociada con enfermedad mieloproliferativa, para lograr una respuesta eficaz de la anemia. Por "respuesta de anemia" se entiende un aumento en el nivel de hemoglobina del paciente o un paciente que era dependiente de transfusión se convierte en independiente de transfusión. De forma deseable, se logra un

5 aumento mínimo en la hemoglobina de 2.0 g/dl de una duración mínima de 8 semanas, que es el nivel de mejora especificado en los criterios de consenso de Grupo de Trabajo Internacional (GTI). Sin embargo, más pequeño, pero aún médicamente significativo, el aumento de la hemoglobina también se considera dentro del alcance de la presente invención. Los sujetos anémicos que se beneficiarían del tratamiento con un compuesto presente incluyen sujetos que se han sometido o están sometidos a quimioterapia o radioterapia, tales como pacientes con cáncer. Una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos son conocidos por tener la consecuencia de reducir el nivel de funcionamiento de las células rojas de la sangre. Adicionalmente, los sujetos que son candidatos de tratamiento son los afectados por trastornos de la sangre, que incluyen cánceres de la sangre que resultan en, o están asociados con, una reducción en el recuento de glóbulos rojos. En realizaciones, los sujetos que se van a tratar son sujetos que tienen anemia asociada con o que resulta de dichas afecciones de la sangre como el síndrome mielodisplásico. En otras realizaciones, los sujetos que se van a tratar son sujetos que tienen anemia asociada con o que resulta de dichas afecciones de la sangre como anemias asociadas con otras neoplasias malignas hematológicas, anemia aplásica, anemia de enfermedad crónica que afectan a las células rojas de la sangre y similares. La anemia de enfermedad crónica se asocia con enfermedades tales como ciertos tipos de cáncer, que incluyen linfomas y la enfermedad de Hodgkin; enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino y polimialgia reumática; infecciones a largo plazo, tales como infección del tracto urinario, VIH y osteomielitis; insuficiencia cardíaca; y enfermedad renal crónica. Adicionalmente, los pacientes con anemia resultante de condiciones asociadas con aumento de la destrucción, supervivencia de glóbulos rojos acortada y secuestro esplénico también se podrían beneficiar del tratamiento con un compuesto presente. En ciertas realizaciones, el sujeto que se va a tratar es un sujeto anémico que experimenta talasemia. En otras realizaciones, el sujeto que se va a tratar es un sujeto diferente de un sujeto que experimenta talasemia. Los pacientes que sufren de estas afecciones por lo tanto se pueden tratar para mejorar su estado de disminución o deficiencia de hemoglobina. Para el tratamiento de dichos sujetos, un compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de comprimidos en una dosis unitaria dentro del rango de 50 mg a 500 mg, que incluye en particular 150 mg o 300 mg, y a una frecuencia de dosificación de 1 a 4 veces al día, tal como una vez o dos veces al día. Para el tratamiento de sujetos anémicos, un compuesto presente se puede administrar en combinación con un fármaco, compuesto o modalidad para tratamiento de anemia seleccionado de transfusión de sangre, suplementos de hierro, terapia con eritropoyetina o darbapoyetina, y similares.

30 En otra realización, un compuesto de la presente invención es para uso en un método para el tratamiento de mieloma múltiple (MM), que incluye en particular células de MM que tienen un fenotipo CD45 negativo (CD45), y/o células de MM que se consideran IL-6 no sensibles. Las células de MM son células de la enfermedad que forman tumores de plasmacitoma que son el sello del mieloma múltiple. "Fenotipo CD45-" se refiere a una célula MM que se pone a prueba negativa o débil, a diferencia de intermedio a brillante, para la expresión de superficie del marcador de proteína conocido como CD45, que es un marcador bien conocido de todas las células hematopoyéticas. El fenotipo CD45 también se atribuye aquí con referencia a una población de células de MM en el que la prevalencia de células CD45 dentro de esa población es superior a por lo menos aproximadamente 10% de la población, tal como por lo menos aproximadamente 15%, o 20%, o 25%, o 30%, o 35%, o 40%, o 45% o por lo menos aproximadamente 50% de esa población. La detección de CD45 en la superficie celular se consigue fácilmente utilizando anticuerpo marcado con fluorescencia CD45 monoclonal y las técnicas establecidas de clasificación de células por activación de fluorescencia (FACS) o cualquier medio relacionado para identificar células que unen el anticuerpo CD45. Se puede hacer referencia por ejemplo a los artículos publicados por Moreau et al, *Haematologica*, 2004, 89(5):547, y por Kumar et al, *Leukemia*, 2005, 19:1466.

45 Las células de MM que son "no sensibles a IL-6" se identifican como células que no dependen para su supervivencia de la presencia de la interleuquina-6 (IL-6). Por lo tanto, una célula MM que no es sensible a IL-6 muestra respuesta insustancial, en términos tales como estimulación del receptor de IL-6 o eventos de señalización en dirección 3', cuando se incuban con una cantidad de otra forma estimulante de IL-6. Dichas células de MM pueden incluir particularmente aquellas células MM que son residentes en el entorno de la médula ósea, y que de este modo crecen en el mismo entorno que las células estromales de la médula ósea, pero también incluyen células de MM en circulación que no están expuestas al entorno óseo.

50 En el ámbito de MM y su progresión y desarrollo, el CD45 representa un marcador temprano de la enfermedad de células de MM. A medida que la enfermedad progresa, se produce un cambio en el fenotipo CD45 de las células, en las que el predominio de células CD45+ se desvanece, y la población de células plasmáticas enfermas se vuelve predominantemente a CD45- (véase Kumar et al, *Leukemia*, 2005, 19(8): 1466). También se produce un cambio en el número de células IL-6 no sensibles, con esta forma de células que se vuelve predominante en las etapas posteriores de la enfermedad.

55 En el presente método, se propone el uso de los presentes compuestos para el tratamiento de células de MM, y tumores de plasmacitoma que surgen de las mismas, que han adquirido fenotipo no sensible a CD45- y/o IL-6. Para el tratamiento de dichos sujetos, un compuesto de la presente invención se puede administrar en forma de comprimidos en una dosis unitaria dentro del rango de 50 mg a 500 mg, que incluye en particular 150 mg o 300 mg, y a una frecuencia de dosificación de 1 a 4 veces al día, tal como una vez o dos veces al día. Para el tratamiento de sujetos MM, un compuesto presente se puede administrar en combinación con otro fármaco, compuesto o modalidad para tratamiento de MM tal como melfalán y bortezomib, y similares.

Con el fin de ejemplificar la naturaleza de la presente invención de tal que se pueda entender más claramente, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitativos.

**EJEMPLOS**

Síntesis del Compuesto

5 Los compuestos de la invención se pueden preparar por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, y como se describe en los procedimientos sintéticos y experimentales mostrados a continuación para los compuestos seleccionados.

Definiciones:

DMAP 4-dimetilaminopiridina

10 DLM diclorometano

TEA trietilamina

DIPEA o DIEA diisopropiletilamina

DMSO dimetilsulfóxido

THF tetrahidrofurano

15 KHMDS hexametil disilazida de potasio

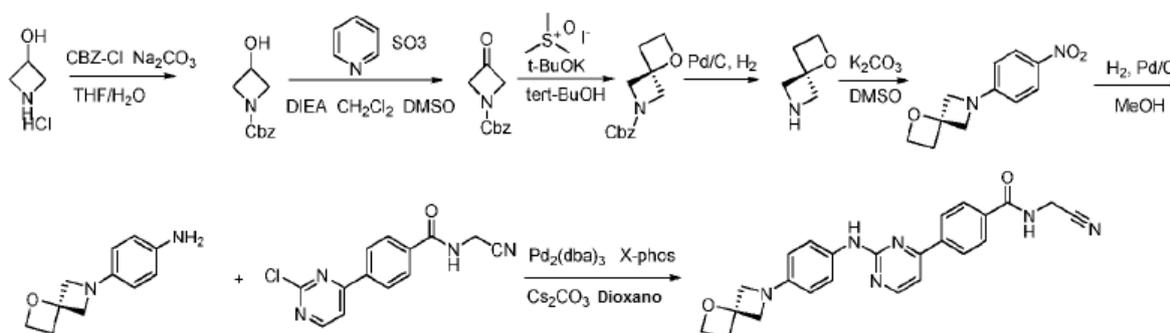
TBAF fluoruro de tetrabutilamonio

TBSCl cloruro de terbutil dimetilsililo

TMSOI yoduro de trimetilsulfoxonio

Ejemplo 1 - Síntesis del compuesto 1

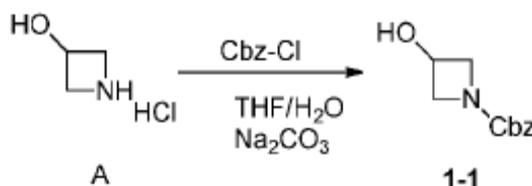
20



Compuesto 1

Síntesis de 1-1

25

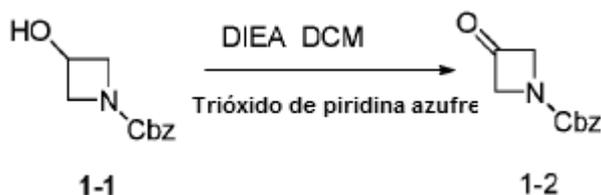


30

A una solución agitada del intermedio A (10.00 g, 91 mmol,) en H<sub>2</sub>O y THF (200 mL) se agregó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19.5 g 0.18 mol), seguido por CBZ-Cl (18.40 g, 0.11 mol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se detuvo mediante adición de HCl ac. 1 M. La capa acuosa se extrajo dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina y se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc/Éter de petróleo 1:4) para

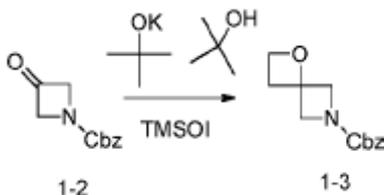
obtener el compuesto 1-1 (13.60 g, 72%) como un sólido blanco. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. TLC:R<sub>f</sub>=0.3 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v) LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>=208; [M+Na]=230.

Síntesis de 1-2



5  
10  
A una solución agitada del intermedio 1-1 (13.60 g, 66 mmol) en DCM (100 mL) a 0°C se agregó DIPEA (57.5 mL 0.33 mol) en forma de gotas, seguida por piridina trióxido de azufre (24.20 g, 0.15 mol) en DMSO (70 mL). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 1 h. La mezcla luego se vertió en hielo-agua y la capa acuosa se extrajo dos veces con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina y se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc/Éter de petróleo 1:2) para obtener el compuesto 1-2 (6.50 g 48%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por espectro de H-RMN. TLC:R<sub>f</sub>=0.7 (gel de sílice, EA:PE=1:1, v/v). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):7.38 (m, 5H),5.17 (s, 2H),4.76 (s, 4H).

Síntesis de 1-3



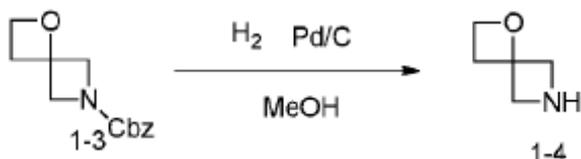
15  
20  
A una solución agitada de yoduro de trimetilsulfonio (4.20 g, 20.5 mmol) en t-BuOH (100 mL) se agregó KOtBu (11.00 g 50.0 mmol) y la reacción se calentó a 50°C durante 1h. Se agregó 1-2 (4.80 g, 42.8 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 50°C durante unas 48 h adicionales, luego se detuvo mediante adición de NH<sub>4</sub>Cl saturado y EA. La capa acuosa se extrajo dos veces con EA y las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (EA/PE,1:2) para obtener el compuesto D (530 mg, 11%) como aceite amarillo.

TLC:R<sub>f</sub>=0.36 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS: [M+1]<sup>+</sup> = 234; [M+Na]=256

25  
<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 7.36 - 7.32 (m, 5H), 5.08(s,2H), 4.51(t, J=7.5 Hz, 2H), 4.23-4.14 (m, 4H), 2.83 (t, J=7.5 Hz, 2 H).

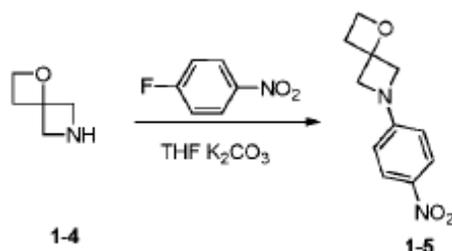
Síntesis de 1-4



30  
A una solución agitada del intermedio 1-3 (860 mg, 3.7 mmol) en MeOH (40 mL) se agregó 10% de Pd/C (100 mg) y la reacción se agitó bajo H<sub>2</sub> (50 psi) a 60°C durante 3 días. La reacción se filtró a través de una almohadilla de Celita y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró bajo presión reducida para obtener el compuesto 1-4 (360 mg, 98%) como un aceite. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. TLC: R<sub>f</sub> =0.04 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>=100

## Síntesis de 1-5

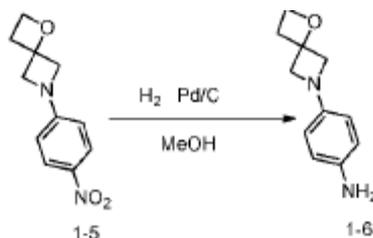


- 5 A una solución agitada del intermedio 1-4 (430 mg, 4.34 mmol) en THF (50 mL) se agregó  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (720 mg 5.21 mmol), seguido por 1-fluoro-4-nitrobenzene (612 mg, 34.34 mmol). La mezcla resultante se agitó a  $80^\circ\text{C}$  durante 5h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua. La capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/Éter de petróleo=1:2) para dar 1-5 (226 mg 28%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS.

- 10 TLC:  $R_f=0.4$  (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 221$ ,  $[\text{M}+\text{Na}] = 243$

## Síntesis de 1-6

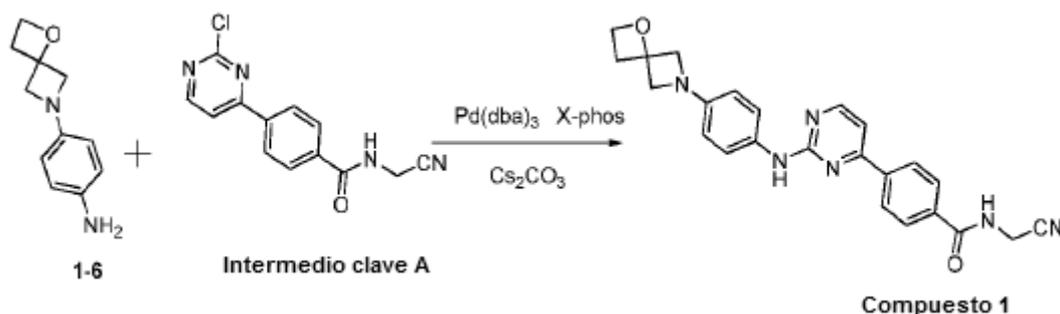


- 15 A una solución agitada del intermedio F (226 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) en MeOH (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (20 mg) y la reacción se agitó bajo 1 atmósfera de  $\text{H}_2$  a  $50^\circ\text{C}$  durante 3 días. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celita y se lavó con MeOH. El filtrado se evaporó bajo presión reducida para dar 1-6 (192 mg, 98%) como sólido rojo. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS y se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 20 TLC:  $R_f=0.25$  (gel de sílice, EA:PE=1:1, v/v)

LC-MS:  $[\text{M}+1]^+=191$

## Síntesis del compuesto 1



- 25 A una solución agitada del intermedio 1-6 (192 mg, 1.0 mmol) en dioxano (40 mL) se agregó  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (658 mg 2.0 mmol) y X-phos (48 mg 0.1 mmol), seguido por  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (92 mg 0.1 mmol). La mezcla resultante se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 6h bajo  $\text{N}_2$ . La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una

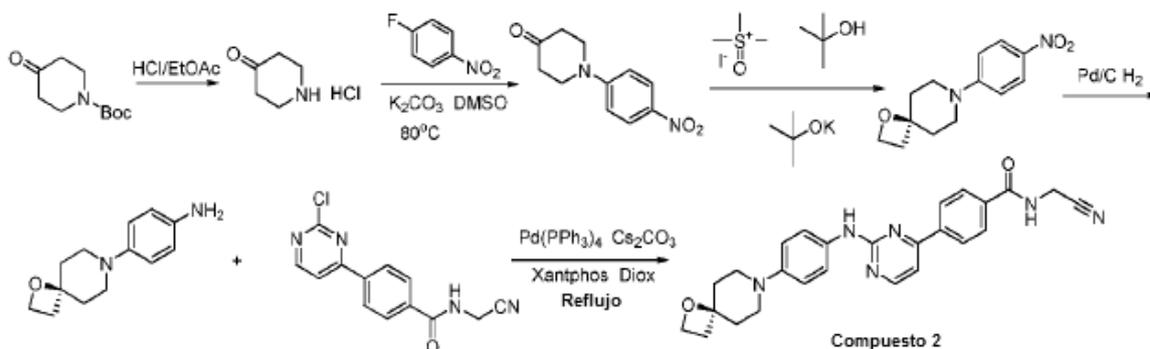
almohadilla de Celita y se lavó con EtOAc. El filtrado se vertió en agua y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se evaporaron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (MeOH/DCM=1:50) para dar el análogo 1 (41 mg 10%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de  $^1\text{H}$ -RMN.

5 TLC: $R_f$ =0.4 (gel de sílice, MeOH/DCM=1:20, v/v)

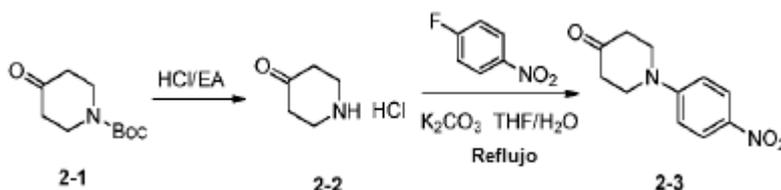
LC-MS:  $[M+1]^+=427$

$^1\text{H}$ -RMN(400 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 8.42 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 8.25 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.98 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1 H), 6.55 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 4.59 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.12 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 3.90 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 2.96 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H).

10 Ejemplo 2 - Síntesis del compuesto 2



Síntesis de 2-2 y 2-3



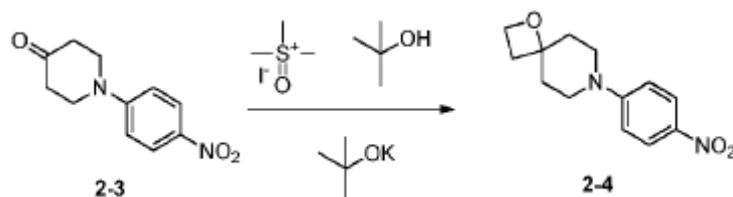
15 A una solución de 2-1 (5.00 g, 25.1 mmol) en EtOAc (10 mL) se agregó HCl 4 M -EtOAc (20 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2h. El precipitado sólido se recolectó mediante filtración y se lavó con EtOAc. La torta de filtro se secó bajo presión reducida para dar un sólido blanco (3.40 g, 100%). Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 A una solución de 2-2 (3.40 g, 25 mmol) en THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL/50 mL) se agregó 1-fluoro-4-nitrobenzene (3.54 g, 25 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (7.60 g, 55 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. Se permitió que la mezcla se enfriara a temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (200 mL x 3). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina (150 mL), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron. El residuo crudo obtenido se lavó con EtOAc (10 mL) para dar un sólido amarillo (4.6 g, 83%). La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

TLC: $R_f$ =0.20 (gel de sílice, EtOAc/Éter de petróleo =1/1, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+=221$

Síntesis de 2-4



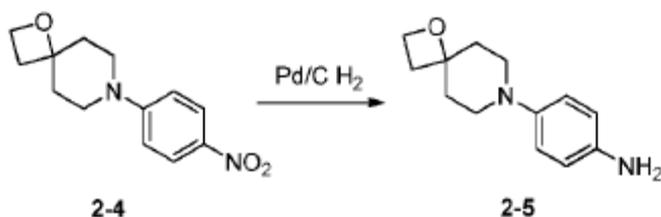
A una solución de yoduro de trimetilsulfoxonio (11.50 g, 52 mmol) en t-BuOH (100 mL) se agregó t-BuOK (5.00 g, 52 mmol) y la reacción se agitó a 50°C durante 1.5 h. Se agregó 2-3 (4.60 g, 21 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 50°C durante unas 48 h adicionales. La mezcla se vertió en H<sub>2</sub>O (300 mL) y se extrajo con EtOAc (200 mL x 3).

- 5 Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina (200 mL), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se lavó con EtOAc (20 mL) y el sólido amarillo obtenido se secó bajo presión reducida para proporcionar el producto (2.30 g, 44%). La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

TLC:R<sub>f</sub>=0.20 (gel de sílice, EtOAc/Éter de petróleo =1/1, v/v)

- 10 LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>=249

Síntesis de 2-5

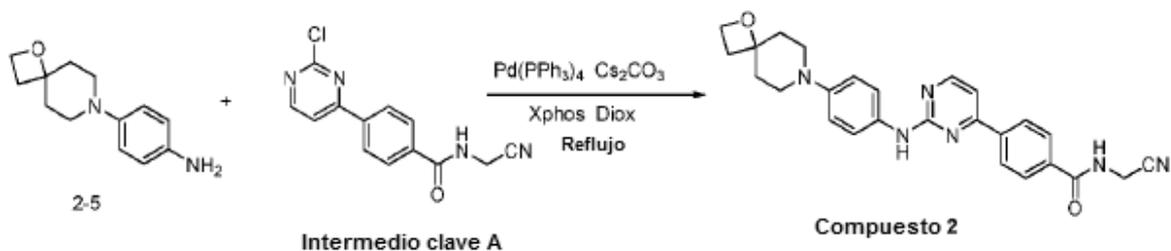


- 15 A una solución de 2-4 (2.30 g, 9.3 mmol) en CH<sub>3</sub>OH (30 ml) se agregó 10% de Pd/C (230 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y se lavó con MeOH. El filtrado se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna con gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH=80/1-20/1) para dar 2-5 (320 mg, 16%) como sólido rojo. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

TLC:R<sub>f</sub>=0.3 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

- 20 LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>=219

Síntesis del compuesto 2



- 25 A una solución de 2-5 (160 mg, 0.73 mmol) y el intermedio clave A (200 mg, 0.73 mmol) en dioxano (30 mL) bajo N<sub>2</sub>, se agregó Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (84 mg, 0.073 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (587 mg, 1.46 mmol) y Xphos (35 mg, 0.073 mmol). La mezcla se calentó a refluxo durante 3h. Se permitió que la reacción se enfriara a temperatura ambiente y se vertió en H<sub>2</sub>O (50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL x 2) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (30 mL), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El residuo crudo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna con gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH=40/1-40/3) para dar el análogo 2 (80 mg, 24%) como sólido amarillo pálido. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.
- 30

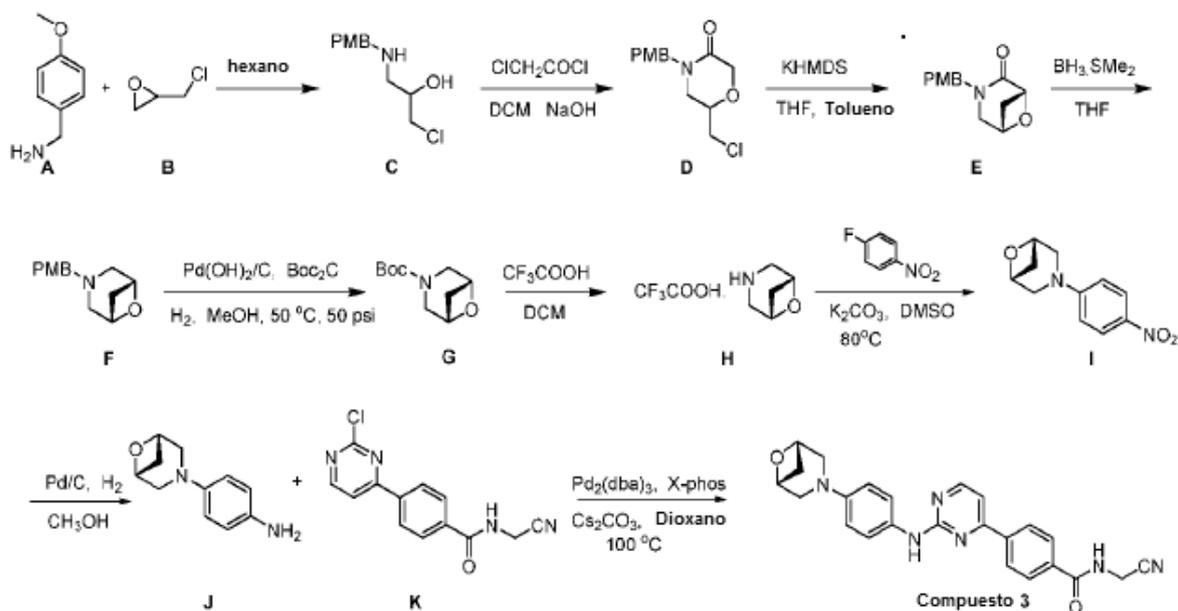
TLC:R<sub>f</sub>=0.32 (gel de sílice, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>=1/40, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+=455$

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$ (ppm): 9.49 (s, 1 H), 9.37 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1 H), 8.53 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1 H), 8.27 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.02 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.63 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.40 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 4.46 - 4.31 (m, 4H), 3.19 (dd,  $J = 8.5, 3.8$  Hz, 2H), 2.98 (dd,  $J = 4.8, 2.5$  Hz, 2H), 2.37 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.87 (dd,  $J = 13.7, 6.9$  Hz, 4H).

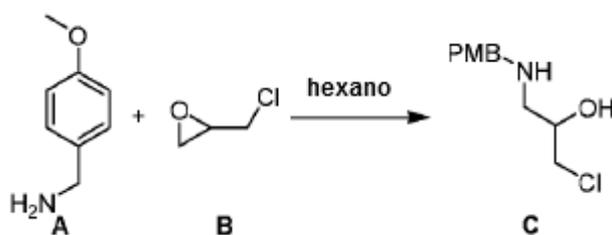
5

Ejemplo 3 - Síntesis del compuesto 3



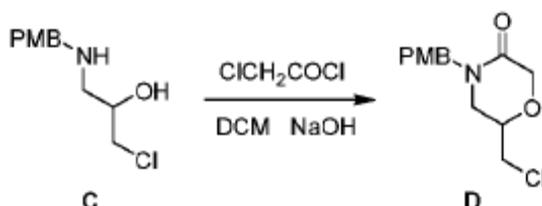
Síntesis de 1-Cloro-3-(4-metoxi-bencilamino)-propan-2-ol

10



Una mezcla de A (50 g, 364.5 mmol) y B (34 g, 367.5 mmol) en hexano (80 mL) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con hexano y MTBE para dar el producto deseado (40 g, 48%) como un sólido blanco. LC-MS: 229.9 ( $[M+1]^+$ ).

15 Síntesis de 6-Clorometil-4-(4-metoxi-bencil)-morfolin-3-ona



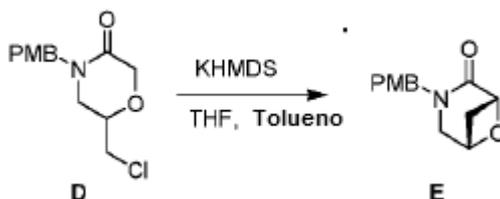
A una solución de C (18 g, 78.4 mmol) en DCM (200 mL) se agregó NaOH ac. 1 M (85 mL) y la solución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ . Una solución de  $\text{ClCH}_2\text{COCl}$  (8.5 mL, 112.9 mmol) en DCM (50 mL) se agregó en forma de gotas y la reacción se agitó a  $0^\circ\text{C}$  durante 1h. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agregó NaOH ac. 10.0 M (60 mL), la

20

mezcla se agitó durante unas 4 h adicionales, luego se diluyó con agua y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con DCM y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para dar el producto crudo, que se purificó sobre gel de sílice con Éter de petróleo/EtOAc (10:1 a 4:1) para dar el producto deseado (11 g, 52%) como un aceite amarillo claro.

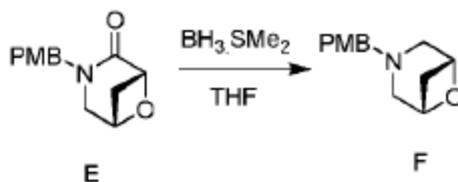
5 LC-MS: 291.8 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

Síntesis de 3-(4-Metoxi-bencil)-6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptan-2-ona



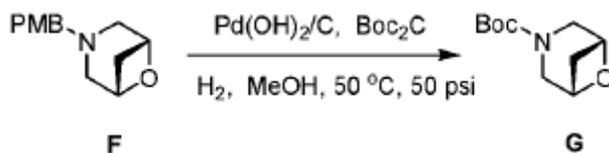
10 A una solución agitada de D (8 g, 29.7 mmol) en THF (140 mL) y tolueno (140 mL) a  $0^\circ\text{C}$  se agregó en forma de gotas una solución de KHMDS (1.0 M en THF 50 mL) y la reacción se agitó durante 1 h. La reacción se detuvo mediante adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ac. (150 mL), y durante 20 minutos a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con EtOAc. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para dar el producto crudo (7.5 g, 100%) que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional. LC-MS: 255.8 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

15 Síntesis de 3-(4-Metoxi-bencil)-6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptano



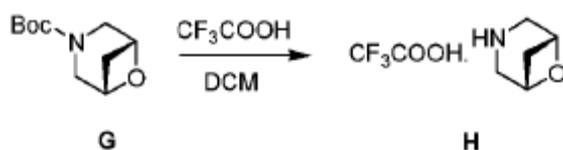
20 A una solución de E (5.6 g, 24 mmol) en THF (130 mL) se agregó en forma de gotas  $\text{BH}_3$  2.0 M en  $\text{Me}_2\text{S}$  (30.9 mL) a  $0^\circ\text{C}$ . La reacción luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se detuvo mediante adición de MeOH y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  acuoso y la mezcla se calentó a  $60^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y la mezcla se extrajo con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se evaporaron para dar el producto crudo que se purificó sobre gel de sílice con Éter de petróleo /EtOAc(8:1 a 1:1) para dar F (2.5 g, 47%) como un aceite incoloro. LC-MS: 220.0 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

25 Síntesis de éster de tert-butiño de ácido 6-Oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptano-3-carboxílico



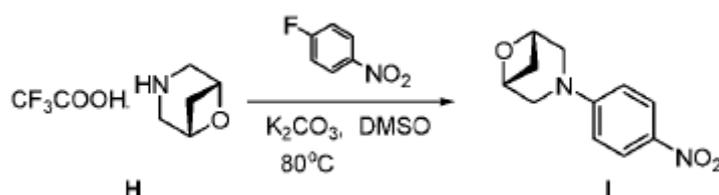
30 A una solución de F (1.0 g, 4.6 mmol) en MeOH (60 mL) se agregó  $\text{Boc}_2\text{O}$  (2.0 g, 9.3 mmol) y  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  sobre carbón activado (1.0 g, 10%) y la mezcla se agitó a  $50^\circ\text{C}$  bajo una atmósfera de  $\text{H}_2$  (50 psi) durante la noche. El LCMS mostró que se completó la reacción. La mezcla se filtró y la torta de filtro se lavó con MeOH. El filtrado se concentró para dar el producto crudo (1.1 g, 100%) como un aceite incoloro sin ninguna purificación. LC-MS: 222.0 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

Síntesis de 6-Oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptano



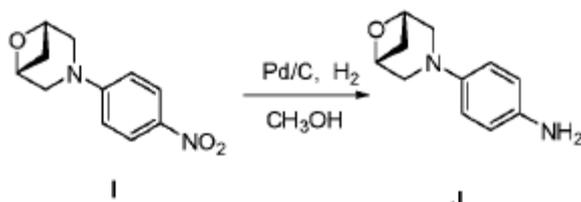
5 A una solución de G (900 mg, 4.5 mmol) en DCM (20 mL) se agregó en forma de gotas una solución de CF<sub>3</sub>COOH (6.0 g) en DCM (10 mL) a 0°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El LCMS mostró que se completó la reacción. El solvente se eliminó en vacío para dar el producto crudo (1.3 g, 100%) como aceite incoloro que se utilizó directamente en la siguiente etapa. LC-MS: 99.8 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de (1S,5R)-3-(4-nitrofenil)-6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptano



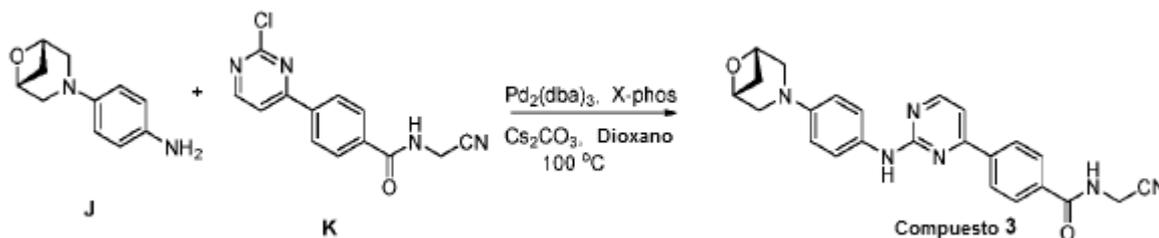
10 A una mezcla agitada de H (720 mg, 3.41 mmol) en DMSO (20 mL) se agregó 1-fluoro-4-nitrobenceno (481 mg, 3.41 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.89 g, 13.64 mmol). La mezcla se calentó a 90°C y se agitó durante 4 h. El TLC mostró que se completó la reacción. La mezcla se vertió en agua (50 mL) y se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) se filtraron y se concentraron. Un precipitado se formó durante evaporación del solvente y se recolectó para conseguir 130 mg del producto. El filtrado se concentró y se purificó mediante columna de gel de sílice (Éter de petróleo /EtOAc=5/1) para conseguir unos 50 mg adicionales del producto deseado (rendimiento total 180 mg 24%). LC-MS: 220.9 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de 4-((1S,5R)-6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptan-3-il)benzenamina



20 A una solución de I (180 mg, 0.82 mmol) en CH<sub>3</sub>OH (30 mL) se agregó Pd/C (10%, 18 mg) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celita y la torta de filtro se lavó con CH<sub>3</sub>OH. El filtrado se concentró para dar el producto deseado (140 mg, 90%) como un sólido marrón. LCMS: 191.0 ([M+1]<sup>+</sup>).

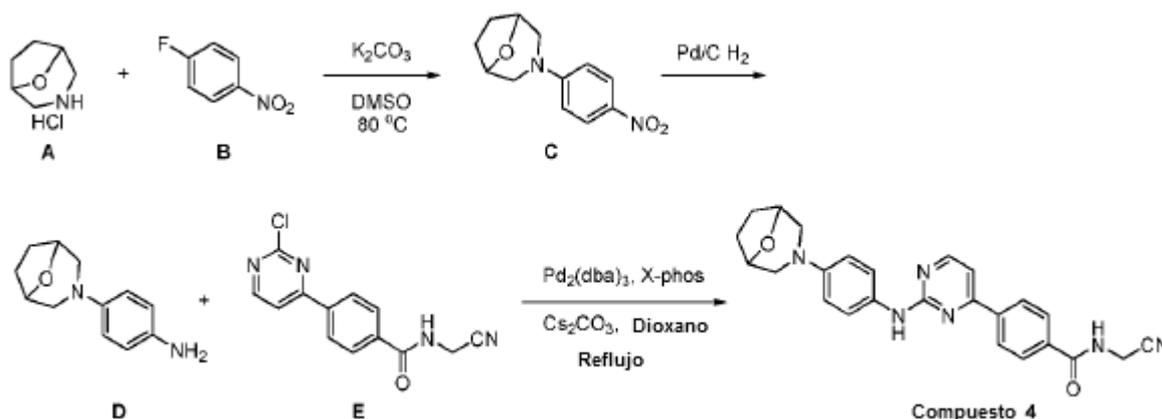
Síntesis de 4-(6-(4-((1S,5R)-6-oxa-3-aza-biciclo[3.1.1]heptan-3-il)fenilamino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil) benzamida



25 A una solución de J (140 mg, 0.74 mmol) y K (202 mg, 0.74 mmol) en dioxano (20 mL) se agregó Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (64 mg, 0.07 mmol), X-phos (33 mg, 0.07 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (531 mg, 1.63 mmol) a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub>. La mezcla se calentó a 100°C y se agitó durante 5 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró; al filtrado se

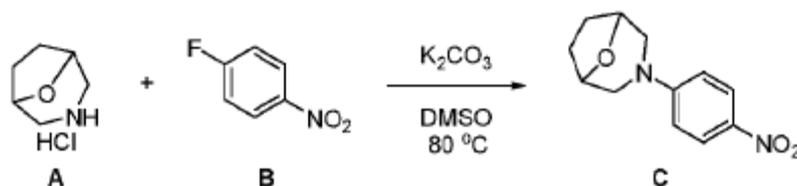
agregó H<sub>2</sub>O (50 mL). El producto se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron para dar el producto crudo que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (PE/Ea=1/1----CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 50/1) para conseguir el producto deseado (100 mg, 32%). LC-MS: 426.2 ([M+1]<sup>+</sup>), <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.38 (s, 1 H), 9.34 (t, J = 5.6 Hz, 1 H), 8.50 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 8.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 6.72 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.70 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 4.34 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.54 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 3.34 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 3.10 (q, J = 6.8 Hz, 1 H), 1.94 (d, J = 8.4 Hz, 1 H). Ejemplo 4 -

Síntesis del compuesto 4



10

Síntesis de 3-(4-nitrofenil)-8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octano

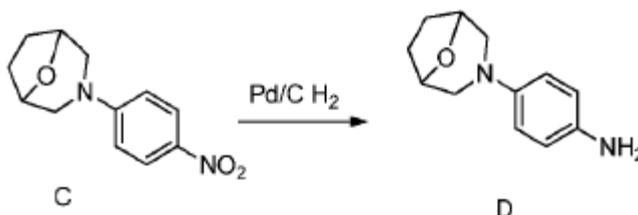


15

A una solución de A (200 mg, 1.34 mmol) y B (226 mg, 1.60 mmol) en DMSO (20 mL) se agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (221 mg, 1.60 mmol) y la mezcla se agitó a 80 °C durante la noche. A la mezcla se agregó H<sub>2</sub>O (50 mL) y el producto se extrajo con EtOAc (50 mL). La fase orgánica se lavó con solución salina (50 mL), se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para dar el producto crudo que se lavó con 2-metoxi-2-metilpropano (15 mL) para dar el producto (240 mg, 76%) como un sólido amarillo. LC-MS: [M+1]<sup>+</sup> 234.9.

Síntesis de 4-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)anilina

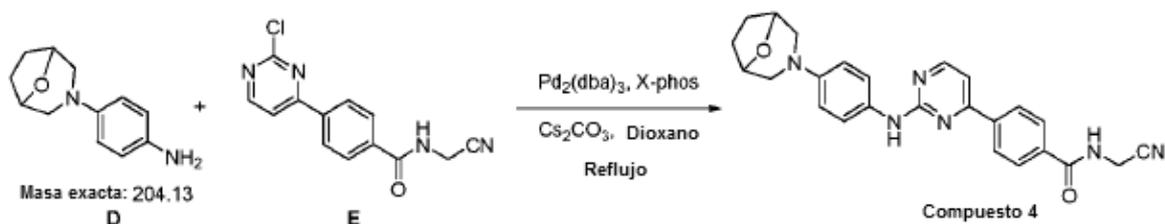
20



25

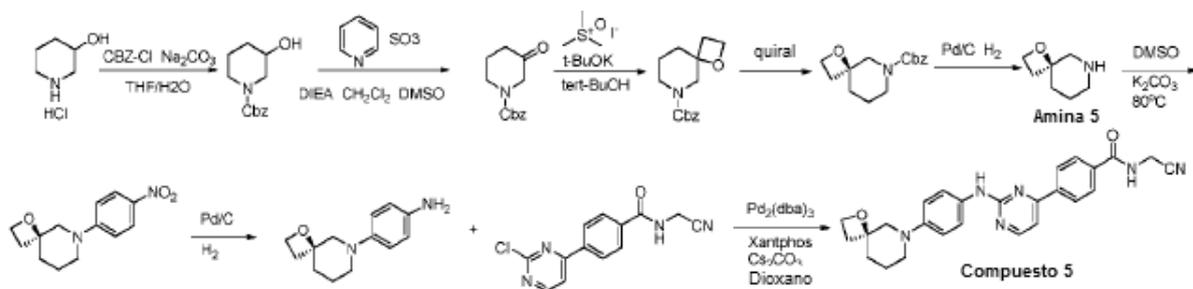
A una solución de C (550 mg, 2.2 mmol) en CH<sub>3</sub>OH (30 mL) se agregó Pd/C (10%, 55 mg) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celita y el filtrado se concentró para dar el producto crudo (480 mg) como un sólido marrón que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. LC-MS: 205.1 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de 4-(2-((4-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida



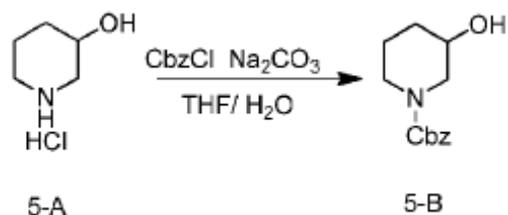
A una solución de D (220 mg, 1.08 mmol) y E (294 mg, 1.08 mmol) en dioxano (30 mL) se agregó Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (100 mg, 0.11 mmol), X-phos (52.4 mg, 0.11 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (870 mg, 2.16 mmol) bajo N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a 80°C durante 8 h. A la mezcla se agregó H<sub>2</sub>O (50 mL) y el producto se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL x 3). La capa orgánica se lavó con solución salina (100 mL), se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para conseguir el producto crudo, que se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH = 50/1 - 30/1) para proporcionar el producto (72 mg, 15%) como un sólido amarillo. LC-MS: 441.2 ([M+1]<sup>+</sup>), <sup>1</sup>H-RMN: 8.46 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 7.07 (s, 1 H), 6.84 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.60 (t, J = 5.6 Hz, 1 H), 4.50 (s, 2H), 4.42 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.31 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 3.01 (dd, J<sub>1</sub>=2.4 Hz, J<sub>2</sub>=11.6 Hz, 2H), 1.97 (s, 4H)

## Ejemplo 5 - Síntesis del compuesto 5



## Síntesis de 5-B

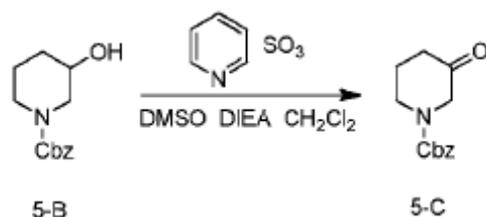
15



A una solución 5-A (10.00 g, 73 mmol) en THF/H<sub>2</sub>O (50 mL/50 mL), se agregó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (23.10 g, 218 mmol). Se agregó en forma de gotas CbzCl (14.90 g, 87 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5h. La mezcla se extrajo con EtOAc (100 mL x 3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna con gel de sílice EtOAc/Éter de petróleo =1/100~1/4 para dar 5-B (16.50 g 96 %) como un aceite incoloro. TLC: R<sub>f</sub>=0.65 gel de sílice EtOAc/Éter de petróleo =1/1 v/v

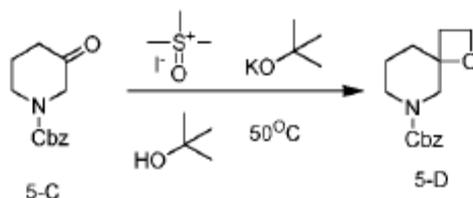
## Síntesis de 5-C

25



Una mezcla agitada de 5-B (16.50 g, 70 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (90 mL) se enfrió a 0 y se agregó DIPEA (45.30 g, 0.35 mol). Se agregó en forma de gotas piridina trióxido de azufre (25.70 g, 0.16 mol) en DMSO (100 mL) a esa temperatura y la mezcla de reacción se agitó a 0 durante 2h. La mezcla se vertió en HCl 4M y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL x 3). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna con gel de sílice EtOAc/Éter de petróleo =1/100~1/6 para dar (14.90 g, 90%) como sólido blancuzco. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. LC-MS:  $[\text{M}+1]^+ = 234$

## Síntesis de 5-D



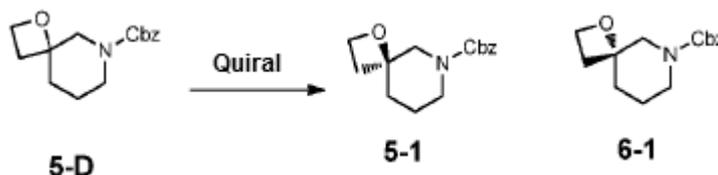
A una suspensión de yoduro de trimetilsulfoxonio (35.20 g, 0.16 mol) en t-BuOH (150 mL) se agregó t-BuOK (17.95 g, 0.16 mol) a 50°C, la mezcla se volvió una suspensión turbia. La mezcla se agitó a la misma temperatura durante 1.5h. El compuesto 5-C (14.90 g, 64 mmol) luego se agregó a esa temperatura y la mezcla se agitó a 50°C durante otras 48h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se sometió a partición entre  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado y EtOAc. La fase orgánica se separó, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó gel de sílice cromatografía de columna (EtOAc/Éter de petróleo =1/6) para dar (2.0 g, 11%) como aceite incoloro. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

TLC:  $R_f = 0.52$  gel de sílice EtOAc/Éter de petróleo =1/1

LC-MS: 262 ( $[\text{M}+1]^+$ ),

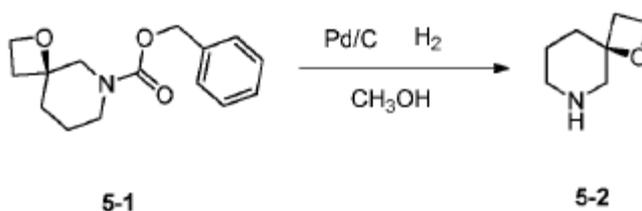
H-RMN: 7.33 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 4.66 - 4.43 (m, 2H), 3.82 (d,  $J = 13.0$  Hz, 1 H), 3.67 - 3.07 (m, 3H), 2.37 (m, 2H), 1.99 - 1.35 (m, 4H).

Separación con HPLC quiral



1-oxa-6-azaespiro[3.5]nonano-6-carboxilato de bencilo racémico se sometió a cromatografía preparativa para separación enantiomérica utilizando una columna CHIRALPAK ADH (0.46cm I.D. x 15 cm L) y 100% de EtOH como eluyente (Índice de flujo: 0.5 mL/min). La concentración en vacío proporciona el pico 1 (0.90 g) como un aceite y pico 2 (0.76 g) como un aceite.

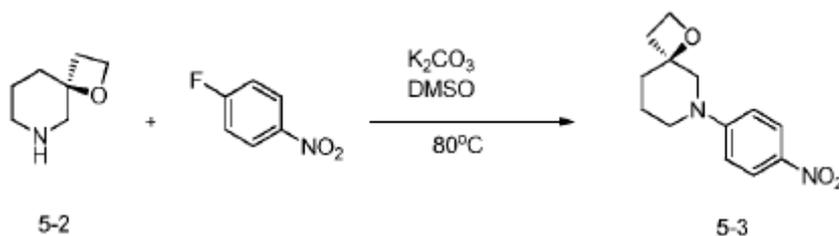
Síntesis de 5-2



A una solución de 5-1 (900 mg, 3.44 mmol) en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (15 mL) se agregó 10% de Pd/C (180 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno (45 psi) a 80°C durante 5 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celita y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró para dar 5-2 (438 mg, 100%) que se utilizó

para la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. LC-MS:  $[M+1]^+=128$ ,  $[2M+1]^+=255$ .

Síntesis de 5-3



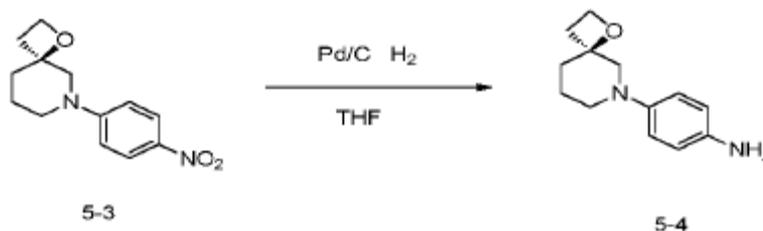
5

A una solución de 5-2 (438 mg, 3.05 mmol) en DMSO (15 mL) se agregó 1-fluoro-4-nitrobenzoceno (430 mg, 3.05 mmol) y  $K_2CO_3$  (506 mg, 3.66 mmol). La mezcla se agitó a  $80^\circ C$  durante 5 horas. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriara a temperatura ambiente. Se agregó agua y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con solución salina, se secaron ( $MgSO_4$ ), se filtraron y se concentraron. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna (Éter de petróleo /EtOAc, 6:1~4:1) para dar 5-3 (469 mg, 62%). TLC:  $R_f=0.37$  (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v)

10

LC-MS:  $[M+1]^+=249$ ,  $[M+Na]=271$ .

Síntesis de 5-4



15

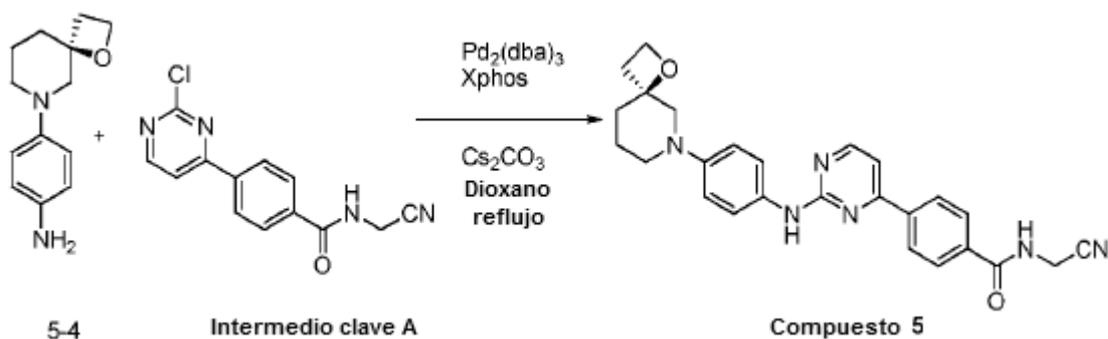
A una solución de 5-3 (360 mg, 1.45 mmol) en THF (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (53 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 5-4 (317 mg, 100%), que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS.

20

TLC:  $R_f=0.30$  (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+=219$ .

Síntesis del compuesto 5



25

A una solución de 5-4 (250 mg, 1.14 mmol), el intermedio clave A (312 mg, 1.14 mmol) y  $Cs_2CO_3$  (750 mg, 2.28 mmol) en dioxano (15 mL) se agregó Xphos (55 mg, 0.114 mmol) y  $Pd_2(dba)_3$  (105 mg, 0.114 mmol). La mezcla de

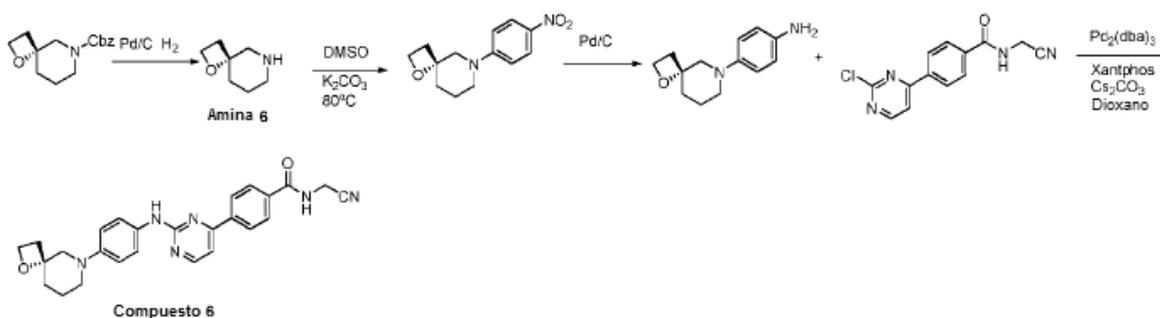
reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno a 100°C durante 7 horas. Se permitió que la reacción se enfriara a temperatura ambiente, se filtró a través de una almohadilla de Celita y se lavó con EtOAc. La mezcla se sometió a partición entre EtOAc y H<sub>2</sub>O y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (Éter de petróleo /EtOAc= 5:1~1:1 luego CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH=50:1) para dar un sólido amarillo pálido. El sólido obtenido se suspendió en metanol (5 mL) y se agitó durante 30 min, se filtró, se lavó con MTBE y se secó bajo presión reducida para dar el análogo 5 (65 mg, 8%) como sólido amarillo pálido. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

TLC: R<sub>f</sub>=0.13 (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v)

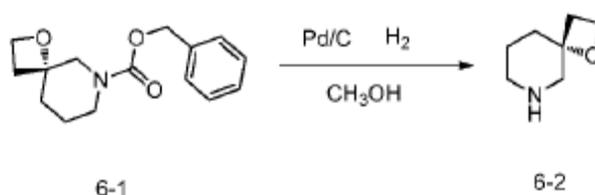
10 LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>=455

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 8.47 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.18 - 7.05 (m, 2H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (t, J = 5.3 Hz, 1 H), 4.61 (d, J = 3.3 Hz, 2H), 4.42 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.44 (d, J = 11.6 Hz, 1 H), 3.21 - 3.12 (m, 1 H), 3.07 (d, J = 11.5 Hz, 1 H), 2.89 (m, 1 H), 2.48 (m, 2H), 2.03 - 1.62 (m, 4H).

15 Ejemplo 6 - Síntesis del compuesto 6

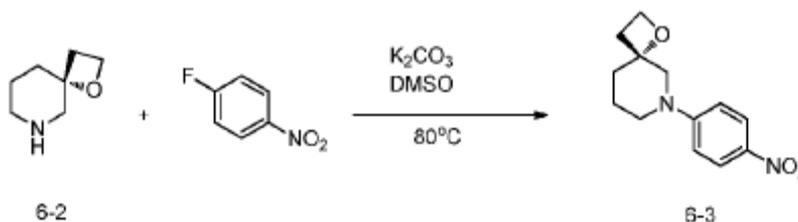


Síntesis de 6-2



20 A una solución de 6-1 (766 mg, 2.93 mmol) en CH<sub>3</sub>OH (15 mL) se agregó 10% de Pd/C (180 mg) y la reacción se agitó a 80°C bajo una atmósfera de hidrógeno durante 5 horas. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriara a temperatura ambiente y el catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita. El filtrado se concentró para dar 6-2 (372 mg, 100%) de producto crudo que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. LC-MS: [M+1]=128

Síntesis de 6-3

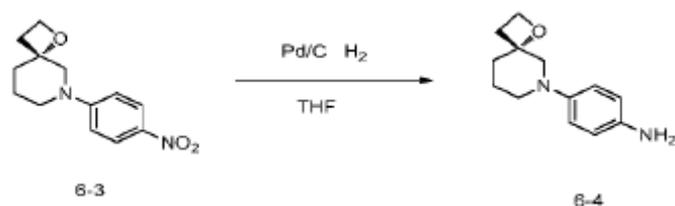


30 Una solución de 6-2(330 mg, 2.59 mmol) en DMSO (15 mL) se agregó 1-fluoro-4-nitrobenzoceno (370 mg, 2.59 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (429 mg, 3.11 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante 5 horas luego se dejó enfriar a temperatura

ambiente. Se agregó agua y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (Éter de petróleo: EtOAc= 6:1~4:1) para dar 6-2 (318 mg, 49%). La estructura se confirmó por espectro de LCMS. TLC:  $R_f=0.37$  (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v)

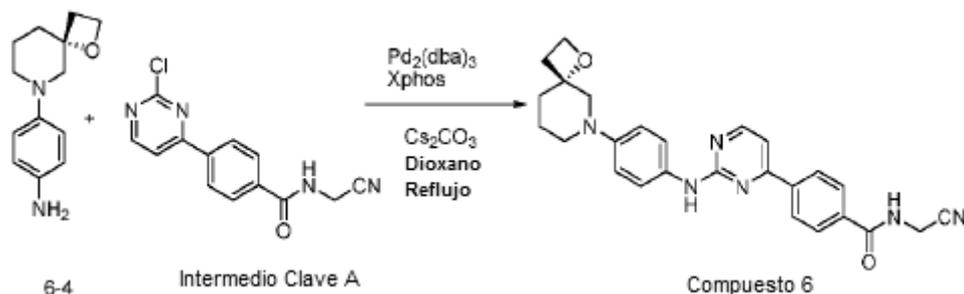
5 LC-MS:  $[M+1]=249$ .

Síntesis de 6-4



10 A una solución de 6-3 (318 mg, 1.28 mmol) en THF (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (32 mg) y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y la almohadilla de filtro se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 6-4 (280 mg, 100%) de producto crudo, que se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. TLC:  $R_f=0.30$  (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v) LC-MS:  $[M+1]^+=219$

15 Síntesis del compuesto 6

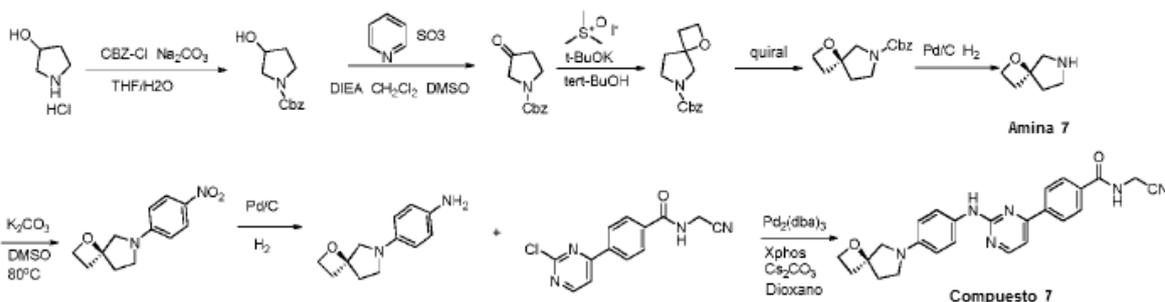


20 A una solución de 6-4(150 mg, 0.69 mmol), el intermedio clave A (188 mg, 0.69 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (448 mg, 1.38 mmol) en dioxano (15 mL) se agregó Xphos (33 mg, 0.069 mmol) y  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (63 mg, 0.069 mmol). La reacción se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno a  $100^\circ\text{C}$  durante 7 horas. Se permitió que la reacción se enfriara a temperatura ambiente, se filtró a través de una almohadilla de Celita y se lavó con EtOAc. Se agregó agua y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (Éter de petróleo /EtOAc= 5:1~1:1 luego  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=80:1$ ) para proporcionar un sólido amarillo pálido. El sólido se suspendió en metanol (2 mL) y se agitó durante 30 min y se recolectó mediante filtración, se lavó con MTBE. El sólido se secó bajo presión reducida para dar el análogo 5 (83 mg, 26%) como sólido amarillo pálido. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN. TLC:  $R_f=0.13$  (gel de sílice, Éter de petróleo: EtOAc=1:1, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+=455$

30  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 8.44 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (s, 1 H), 7.08 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 6.96 (m, 2H), 4.67 - 4.53 (m, 2H), 4.40 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.39 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.11 (m, 2H), 2.93 (m, 1 H), 2.57 - 2.38 (m, 2H), 2.01 - 1.66 (m, 4H). Ejemplo 7 -

Ejemplo 7 - Síntesis del compuesto 7



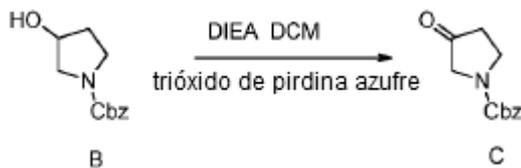
Síntesis de B



- 5 A una solución agitada del intermedio A (10.00 g, 81 mmol) en H<sub>2</sub>O/THF=1/1(200 mL) se agregó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (24.30 g 0.23 mol) y Cbz-Cl (23.50 g, 0.14 mol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detuvo mediante adición de HCl 1 M y la capa acuosa se extrajo dos veces con DCM. Las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/Éter de petróleo =1:4) para dar B (15.50 g 87%) como sólido blanco. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. TLC:RF=0.3 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)
- 10

LC-MS: [M+H]<sup>+</sup>= 222 ; [M+23]= 244.

Síntesis de C



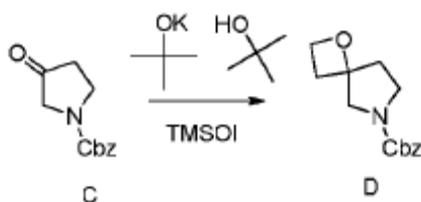
- 15 A una solución agitada del intermedio B (15.50 g, 0.07 mol) en DCM (100 mL) se agregó DIPEA (35.2 mL 0.21 mol) a 0°C. Una solución de piridina trióxido de azufre (25.2g, 0.16 mol) en DMSO (70 mL) se agregó en forma de gotas y la mezcla resultante se agitó a 0°C durante 1h. La reacción se detuvo mediante adición de H<sub>2</sub>O y la capa acuosa se extrajo dos veces con DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/Éter de petróleo =1:2) para dar compuesto C (13.80 g, 90%) como sólido amarillo. Su estructura se confirmó por espectro de LC-MS.
- 20

TLC:R<sub>f</sub>=0.7 (gel de sílice, EA:PE=1:1, v/v)

LC-MS: [M+23]= 242.

Síntesis de D

25



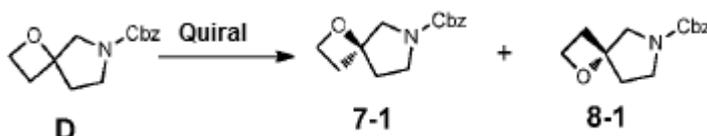
- 5 A una solución agitada de yoduro de trimetilsulfoxonio (32.70 g, 0.15 mol) en (100 mL) se agregó t-BuOK (14.30 g 0.13) y la reacción se agitó a 50°C durante 1h. Luego se agregó el intermedio C (13.00 g 60 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 50°C durante unas 48 h adicionales. La mezcla de reacción se detuvo mediante adición de solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se sometió a partición contra EtOAc. La capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc y las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc /Éter de petróleo =1:2) para dar D (2.70 g 18%) como aceite amarillo. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

TLC:R<sub>f</sub>=0.36 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS: [M+H]<sup>+</sup>=248 ; [M+Na]=270

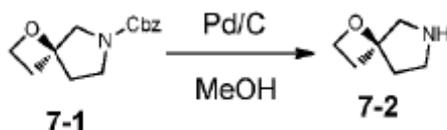
- 10 H-RMN(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm): 7.37 (m,5H), 5.14 (d, 2H), 4.53 (m, 2H), 3.85-3.47 (m, 4H), 2.67 (m, 2H), 2.38-1.98 (m, 2H).

Separación con HPLC quiral



- 15 1-oxa-6-azaespiro[3.4]octano-6-carboxilato de bencilo racémico se sometió a cromatografía preparativa utilizando una columna CHIRALPAK AYH (0.46cm I.D. x 15 cm L). Hexano/ETOH =50/50 se utilizaron como eluyente (Índice de flujo: 1 mL/min). La concentración en vacío da el pico 1 (1.12 g) como un aceite y el pico 2 (1.33 g) como un aceite.

Síntesis de 7-2

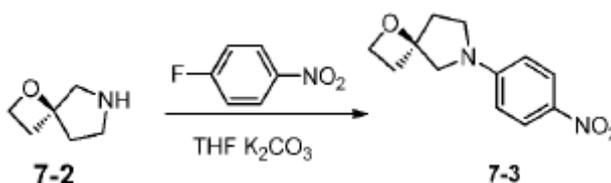


- 20 A una solución agitada del intermedio 7-1 (1.10 g, 4.5 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (110 mg) y la reacción se calentó a reflujo bajo una atmósfera de hidrógeno durante 2 días. Se permitió que la reacción se enfriara a temperatura ambiente y luego se filtró a través de una almohadilla de Celita. La almohadilla de filtro se lavó con MeOH y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 7-2 (490 mg, 97%) como un aceite. La estructura se confirmó por LC-MS. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

TLC: R<sub>f</sub> =0.04 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>= 114.

Síntesis de 7-3

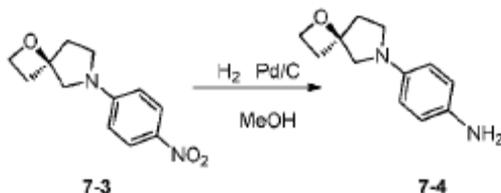


- 30 A una solución agitada de 7-2 (490 mg, 4.3 mmol) en THF (50 mL) se agregó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (718 mg, 5.2 mmol), seguido por 1-fluoro-4-nitrobenceno (612 mg, 4.3 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80°C durante 5h. Se permitió que la reacción se enfriara a temperatura ambiente y se vertió en agua. La capa acuosa se extrajo con EtOAc y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron. El producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/Éter de petróleo =1:2) para dar 7-3 (560 mg 55%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por LC-MS.

TLC:R<sub>f</sub>=0.4 (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS:  $[M+H]^+ = 235$ ;  $[M+Na] = 257$

Síntesis de 7-4

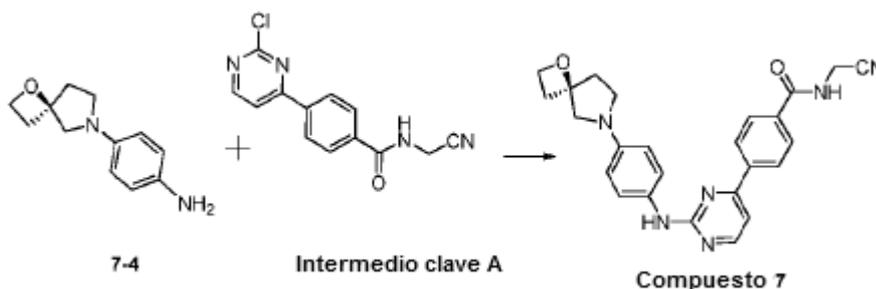


- 5 A una solución agitada de 7-3 (560 mg, 2.4 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (50 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de Celita y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 7-4 (486 mg, 99%) como sólido rojo. La estructura se confirmó por LCMS. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

TLC:  $R_f = 0.25$  (gel de sílice, EA:PE=1:1, v/v)

- 10 LC-MS:  $[M+H]^+ = 205$ .

Síntesis del compuesto 7



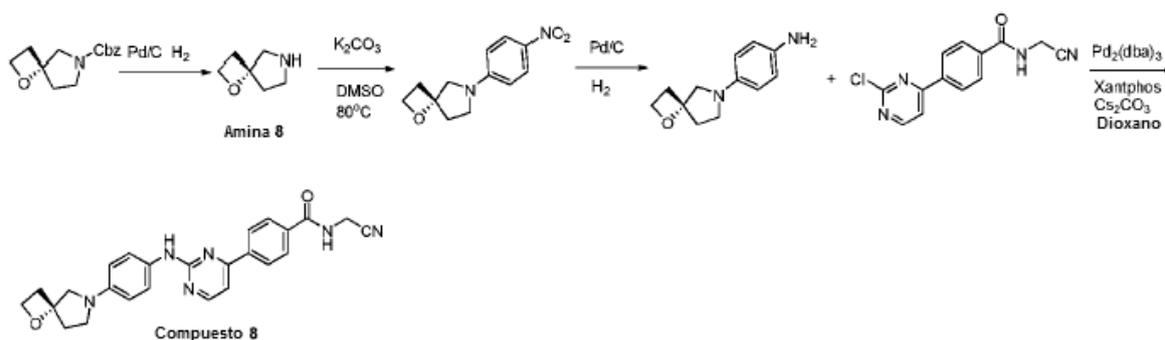
- 15 A una solución agitada de 7-4 (243mg, 1.19 mmol) en dioxano (40 mL) se agregó  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (775 mg 2.38 mmol) y X-phos (57 mg 0.119 mmol), seguido por  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (109 mg, 0.119mmol). La mezcla resultante se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 6h bajo  $\text{N}_2$ . La reacción se filtró a través de una almohadilla de celita y la almohadilla de filtro se lavó con EtOAc. El filtrado se sometió a partición contra agua y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron. El producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía flash (MeOH/DCM=1:50) para dar el análogo 7 (165 mg, 31%) como un sólido amarillo. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.
- 20

TLC:  $R_f = 0.4$  (gel de sílice, MeOH/DCM=1:20, v/v)

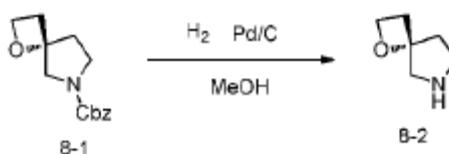
LC-MS:  $[M+H]^+ = 441$

- 25 H-RMN(400 MHz,  $d_4$ -DMSO)  $\delta$ (ppm): 9.36 (s, 2H), 8.51 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1 H), 8.26 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 8.01 - 7.98 (m, 2H), 7.66 - 7.52 (m, 2H), 7.37 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1 H), 6.60 - 6.48 (m, 2H), 4.50 - 4.31 (m, 4H), 3.58 - 3.52 (m, 1 H), 3.29 - 3.22 (m, 2H), 2.81 - 2.62 (m, 2H), 2.39 - 2.11 (m, 2H).

Ejemplo 8 - Síntesis del compuesto 8



## Síntesis de 8-2

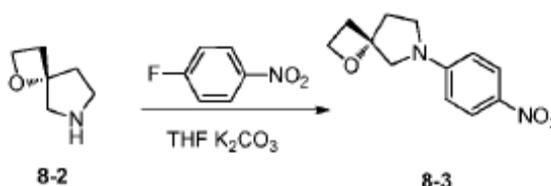


- 5 A una solución agitada de 8-1 (1.33 g, 5.4 mmol) en MeOH (20 mL) se agregó 10% de Pd/C (130 mg) y la reacción se calentó a 80°C bajo una atmósfera de hidrógeno durante 2 días. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y la almohadilla de filtro se lavó con MeOH. El filtrado se evaporó bajo presión reducida para dar 8-2 (608 mg 100%) como un aceite. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 10 TLC:  $R_f = 0.04$  (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+ = 114$ .

## Síntesis de 8-3

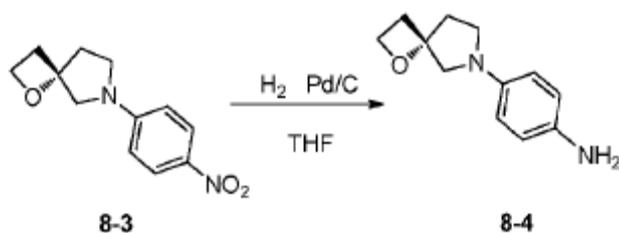


- 15 A una solución agitada de 8-2 (623 mg, 5.5 mmol) en THF (50 mL) se agregó  $K_2CO_3$  (914 mg 6.6 mmol), seguido por 1-fluoro-4-nitrobenzene (777 mg, 5.5 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80°C durante 5h. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriara a temperatura ambiente y se vertió en agua. La capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc y las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron ( $Na_2SO_4$ ), se filtraron y se evaporaron para proporcionar el producto crudo que se purificó mediante cromatografía flash (EtOAc/Éter de petróleo=1:2) para dar 8-3 (677 mg, 52%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS.
- 20

TLC:  $R_f = 0.4$  (gel de sílice, EA:PE=1:2, v/v)

LC-MS:  $[M+H]^+ = 235$ ,  $[M+Na]^+ = 257$ .

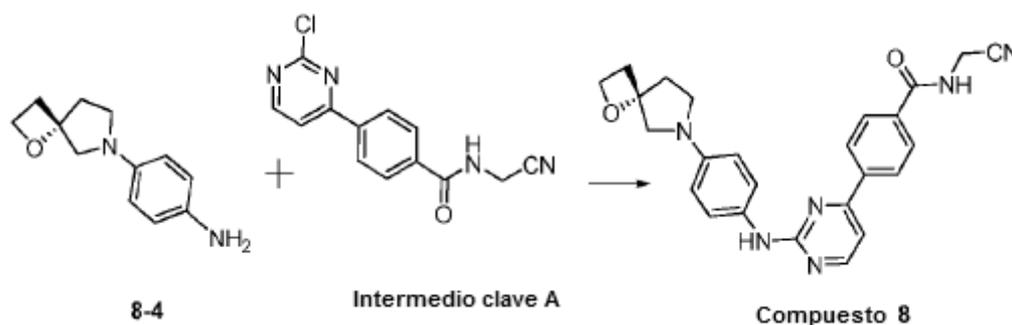
## Síntesis de 8-4



5 A una solución agitada de 8-3 (677 mg, 2.9 mmol) en MeOH (50 mL) se agregó 10% de Pd/C (60 mg) y la reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y la almohadilla de filtro se lavó con MeOH. El filtrado se concentró bajo presión reducida para dar 8-4 (554 mg, 93%) como sólido rojo. La estructura se confirmó por espectro de LC-MS. TLC:  $R_f = 0.25$  (gel de sílice, EA:PE=1:1, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+ = 205$ .

Síntesis del compuesto 8



10 A una solución agitada de 8-4 (286 mg, 1.4 mmol) en dioxano (40 mL) se agregó  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (912 mg 2.8 mmol) y X-phos (67 mg 0.14 mmol), seguido por  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (128 mg, 0.14 mmol). La mezcla resultante se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 6h bajo una atmósfera de nitrógeno. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de celita y la almohadilla se lavó con EtOAc. El filtrado se sometió a partición contra agua y se extrajo dos veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas luego se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash (MeOH/DCM=1:50) para dar el análogo 8 (167 mg, 27%) como sólido amarillo. La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

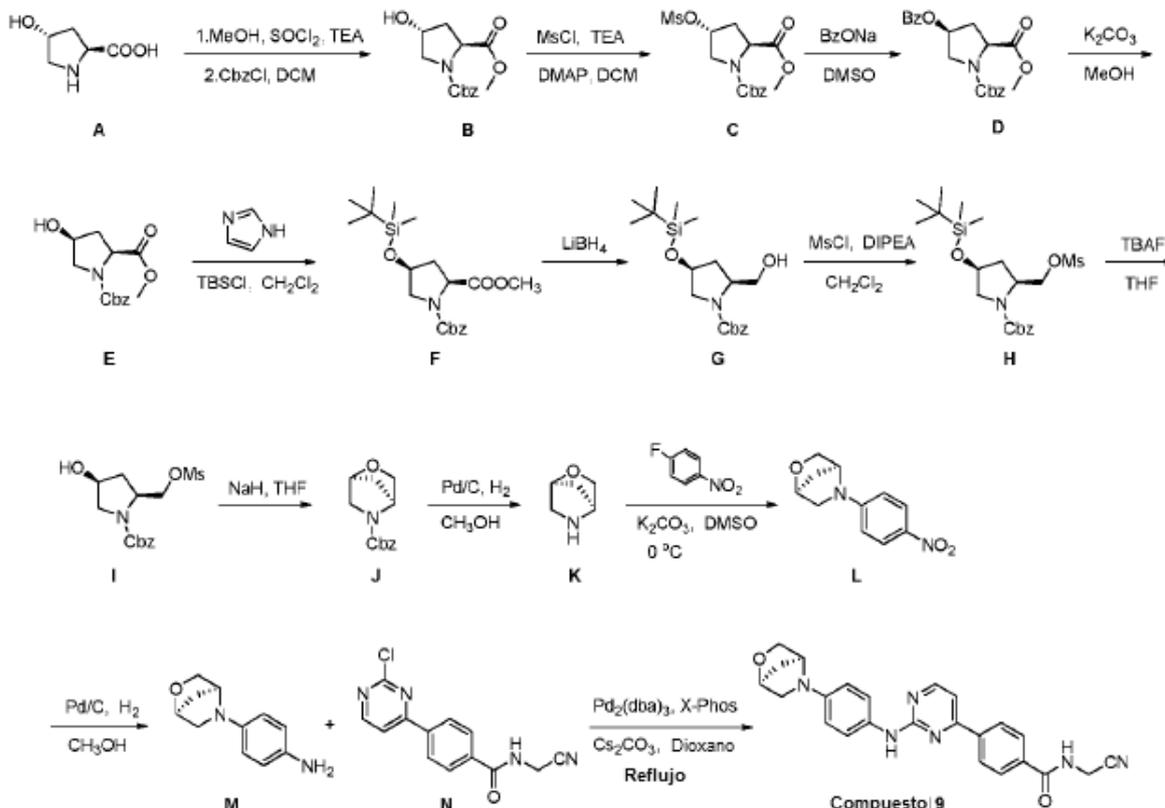
TLC:  $R_f = 0.4$  (gel de sílice, MeOH/DCM=1:20, v/v).

20 LC-MS: 441 ( $[M+1]^+$ ).

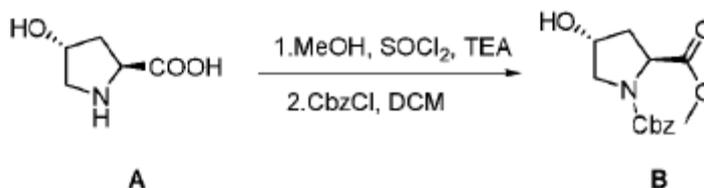
H-RMN(400 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$ (ppm): 9.36 (s, 2H), 8.51 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1 H), 8.26 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 8.09 - 7.98 (m, 2H), 7.66 - 7.52 (m, 2H), 7.37 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 6.60 - 6.48 (m, 2H), 4.50 - 4.31 (m, 4H), 3.58 - 3.52 (m, 2H), 3.29 - 3.22 (m, 2H), 2.81 - 2.62 (m, 2H), 2.39 - 2.11 (m, 2H).

Ejemplo 9 - Síntesis del compuesto 9

25

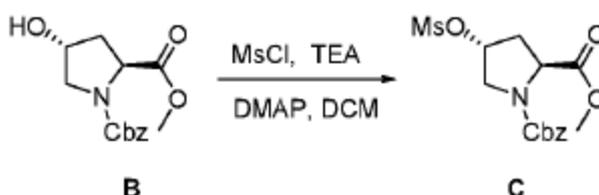


Síntesis de 4-hidroxipirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-1-bencil 2-metilo



- 5 A a una solución de A (50 g, 381.6 mmol) en MeOH (350 mL) se agregó  $\text{SOCl}_2$  (30 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h y luego se calentó a  $65^\circ\text{C}$  durante la noche. El solvente se evaporó y el residuo se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (800 mL). La mezcla se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ , se agregó TEA (130 mL) y luego CbzCl (62.2 mL) se agregó en forma de gotas. Después de agitación a  $0^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, la reacción se detuvo al verter en una solución acuosa de ácido cítrico (10%, 800 mL) y el producto se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para dar el producto crudo (64 g, 60%) como aceite amarillo claro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC-MS: 301.8 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).
- 10

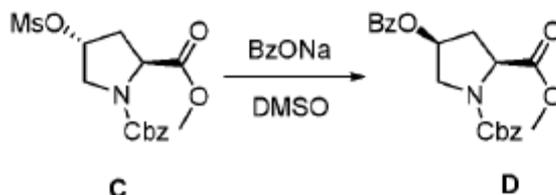
Síntesis de 2-metil 4-(metilsulfonilo)pirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2S,4R)-1-bencilo



- 15 A a una solución de B (50 g, 179 mmol) en DCM (1500 mL) se agregó en forma de gotas TEA (29 mL) a  $0^\circ\text{C}$ , seguido por MsCl (18.8 mL). Una cantidad catalítica de DMAP (6.8 g) se agregó y la mezcla se agitó a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 h, luego a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió en agua helada y el producto se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con ac. HCl al 10%,  $\text{NaHCO}_3$  ac. al 5% y agua, se secaron

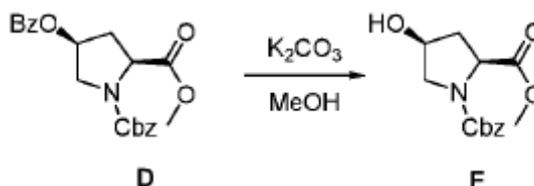
( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para dar el producto crudo (65 g, 100%) como aceite incoloro. LC-MS: 379.8 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

Síntesis de 2-metil 4-(benzoiloxi)pirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-bencilo



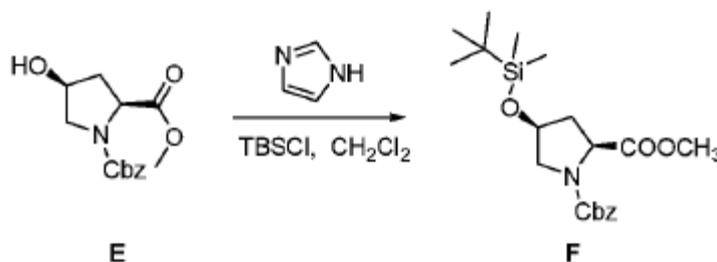
5 A una solución de C (60.00 g, 0.16 mol) en DMSO (600 mL) se agregó BzONa (49.00 g, 0.34 mol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se calentó a  $90^\circ\text{C}$  durante la noche. La mezcla de reacción se vertió en agua y EtOAc. La fase orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron, se concentraron y se purificaron mediante cromatografía de columna (Éter de petróleo /EtOAc = 10:1 a 5:1) para dar el producto (28 g, 46%) como un sólido blanco. LC-MS: 383.9 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

Síntesis de 2-metil 4-hidroxipirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-bencilo



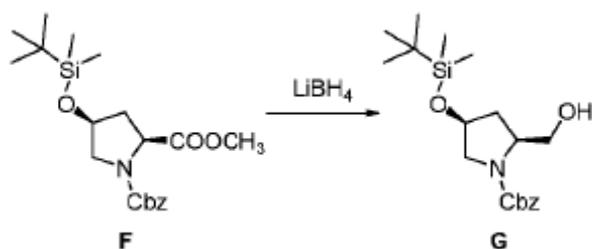
15 A una solución de D (23 g, 65.8 mmol) en MeOH (100 mL) se agregó  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (9.1 g, 65.8 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ , y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El TLC mostró que se completó la reacción. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró en vacío para eliminar MeOH, el residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con agua, solución salina, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) se filtró y se concentró para dar el producto crudo que se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (Éter de petróleo /EtOAc=4/1-1/1) para conseguir el producto deseado (12.6 g, 70%) como aceite amarillo claro.

20 Síntesis de 2-metil 4-(tert-butildimetilsililoxi)pirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2S,4S)-1-bencilo



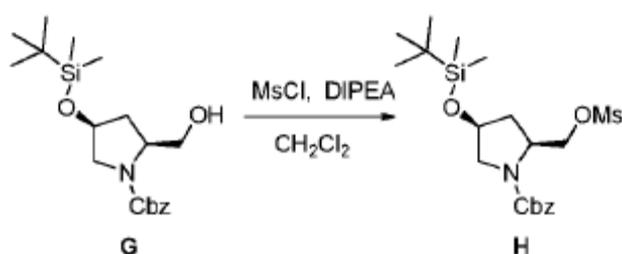
25 A una solución de E (11.50 g, 41 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (170 mL) se agregó imidazol (5.60 g, 82 mmol) y TBSCl (11.2 g, 74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La mezcla de reacción se vertió en agua y EtOAc, la capa orgánica se separó, se lavó con agua, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtró y se concentró para dar el producto deseado (15.9 g, 99%) como aceite incoloro.

Síntesis de 4-(tert-butildimetilsililoxi)-2-(hidroximetil)-pirrolidina-1-carboxilato de (2S,4S)-bencilo

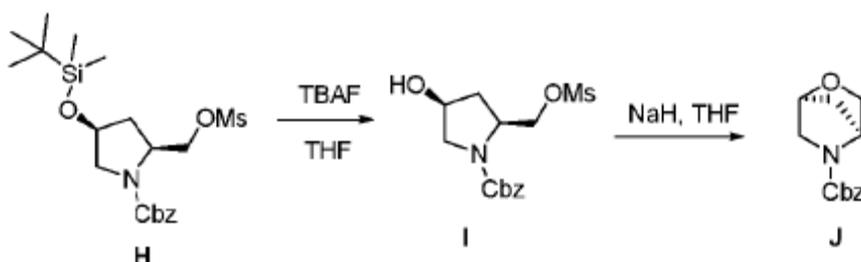


- 5 A una solución de F (15.0 g, 38 mmol) en THF (50 mL) se agregó LiBH<sub>4</sub> (1.9 g, 87 mmol) a 0°C, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, El TLC mostró que se completó la reacción y agua se agregó. El producto se extrajo con EtOAc y la capa orgánica se lavó con solución salina, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para dar el producto crudo (13.2 g, 95%) como aceite incoloro, que se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Síntesis de 4-(tert-butildimetilsililoxi)-2-((metilsulfoniloxi)-metil)pirrolidina-1-carboxilato de (2S,4S)-bencilo

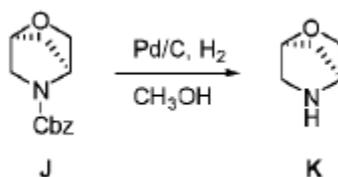


- 10 Una solución de G (13.0 g, 35.6 mmol) y DIPEA (12.5 mL) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) se trató con MsCl (4.2 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 minutos, luego a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. La reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con agua, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para dar el producto crudo (16.5 g, 100%) como aceite amarillo claro que se utilizó en la siguiente etapa sin ninguna purificación. LC-MS: 465.7 ([M+Na]<sup>+</sup>).
- 15 Síntesis de 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano-5-carboxilato de (1S, 4S)-bencilo



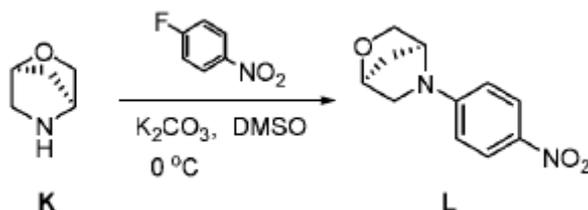
- 20 Una solución de H (15.6 g, 35.2 mmol) en THF (400 mL) se trató con TBAF (30.0 g, 114.7 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se enfrió a 0°C y se agregó NaH (1.5 g, 62.5 mmol). Se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se detuvo al verter la mezcla en agua y el producto se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó en vacío para dar el producto crudo purificado mediante cromatografía flash (gel de sílice, éter de petróleo /EtOAc = 10:1~3:1) para dar el producto deseado (6.2 g, 76%) como aceite amarillo claro. LC-MS: 255.8 ([M+Na]<sup>+</sup>).

Síntesis de (1S,4S)-2-oxa-5-aza-bicyclo[2.2.1]heptano



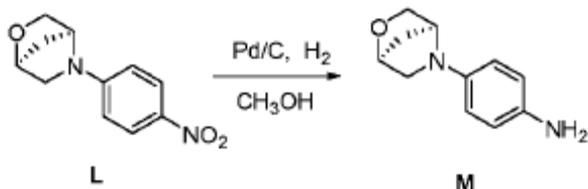
Una solución de G (1.80 g, 7.7 mmol) en MeOH (50 mL) se hidrogenó en la presencia de Pd/C (10%, 0.9 g) bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> a 50°C. La mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celita y el solvente se eliminó en vacío para dar el producto crudo (1.3 g, 100%) como aceite, que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin ninguna purificación. LC-MS: 99.9 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de (1S, 4S)-2-(4-nitrofenil)-5-oxa-2-aza-biciclo[2.2.1]heptano



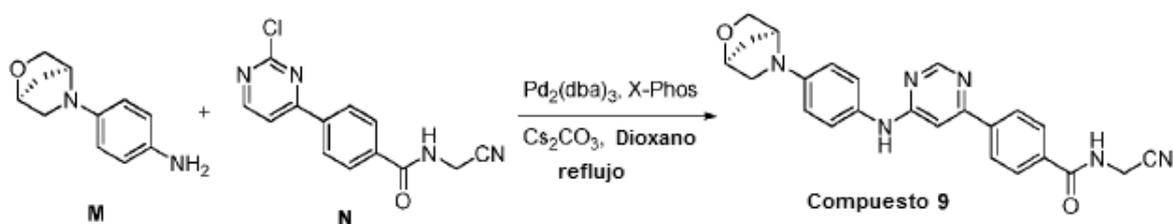
Una mezcla de K (1.3 g, 13.1 mmol), 1-fluoro-4-nitrobenzene (2.2 g, 15.7 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.16 g, 15.7 mmol) en DMSO (40 mL) se calentó a 80°C durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se agregó agua y se agitó durante 10 minutos. El producto se extrajo con EtOAc y la capa orgánica se lavó con agua se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron para dar el producto crudo que se lavó con MTBE para dar el producto deseado (1.2 g, 42%) como un sólido amarillo. LC-MS: 221 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de 4-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)anilina



A una solución de L (600 mg, 2.7 mmol) en CH<sub>3</sub>OH (50 mL) se agregó Pd/C (60 mg) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de H<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró a través de Celita para eliminar el catalizador y el filtrado se concentró para dar el producto deseado (500 mg, 96%) como un sólido rojo. LC-MS: 191.0 ([M+1]<sup>+</sup>).

Síntesis de 4-(6-((4-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)-pirimidin-4-il)-N-(cianometil) benzamida

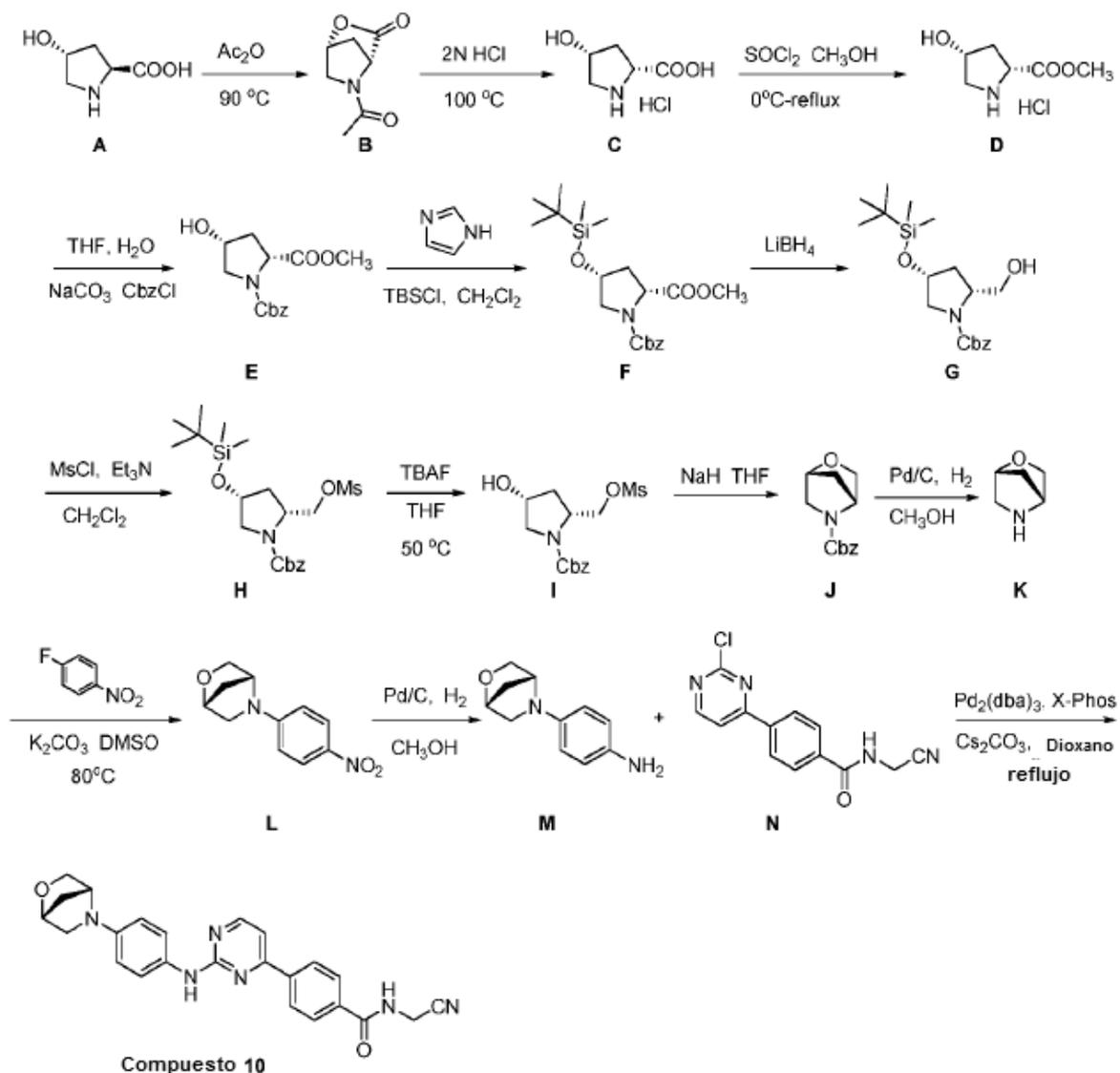


A una solución de M (315 mg, 1.66 mmol) y N (450 mg, 1.66 mmol) en dioxano (50 mL), se agregó Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (150 mg, 0.17 mmol), X-phos (78 mg, 0.16 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.21 g, 3.7 mmol) a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub>. La mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante 5h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de papel de filtro; el filtrado se sometió a partición contra agua (50 mL). La capa acuosa se extrajo con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron para dar el producto crudo que se purificó mediante gel de sílice (PE/EA=1/1 luego CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH=50/1) para conseguir el producto deseado (70 mg, 10%) como un sólido amarillo. LC-MS: 441.2 ([M+1]<sup>+</sup>), <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO) δ 9.39 (s, 1H), 9.36 (t, J = 6.0 Hz),

8.51 (d, J = 5.1 Hz, 1 H), 8.27 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 6.62 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.60 (s, 1 H), 4.51 (s, 1 H), 4.36 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 3.72 (ABq, J = 7.0 Hz,  $\Delta\nu$  = 21.2 Hz, 2H), 3.51 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 2.94 (d, J = 9.4 Hz, 1 H), 1.95-1.82 (m, 1 H).

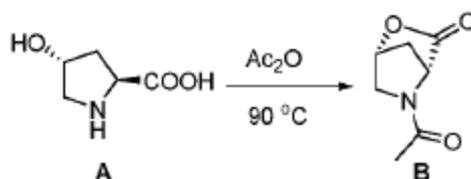
## Ejemplo 10 - Síntesis del compuesto 10

5



## Síntesis de (1R,4R)-5-acetil-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona

10

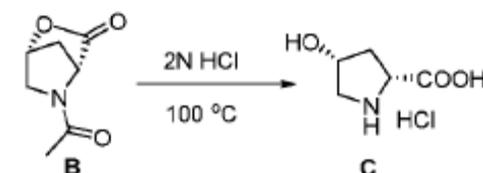


Una mezcla agitada de A (50 g, 381.6 mmol) y  $\text{Ac}_2\text{O}$  (305 mL) se calentó a  $90^\circ\text{C}$  durante 16 h bajo  $\text{N}_2$ , el solvente se evaporó bajo presión reducida, el residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. La capa acuosa se extrajo

adicionalmente con  $\text{CHCl}_3$  y las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), se filtraron y se evaporaron. El residuo obtenido se recrystalizó a partir de EtOAc para obtener el producto (24 g, 40%) como un sólido blanco.

Síntesis de clorhidrato de ácido (2R,4R)-4-hidroxipirrolidina-2-carboxílico

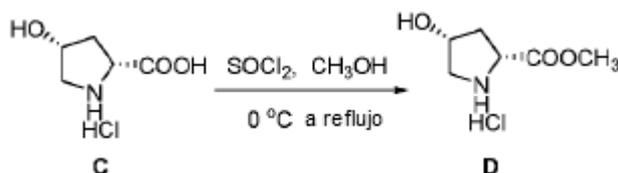
5



La mezcla de B (14 g, 90.3 mmol) en HCl 2N (160 mL) se agitó durante la noche a  $100^\circ\text{C}$ . El LCMS mostró que se completó la reacción, el solvente se eliminó en vacío y el residuo se recrystalizó en EtOAc para dar el producto deseado como un sólido blanco. LC-MS: 205.1 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

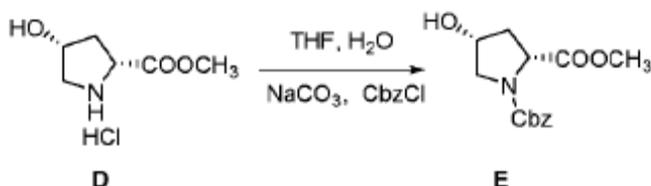
Síntesis de clorhidrato de 4-hidroxipirrolidina-2-carboxilato de (2R,4R)-metilo

10



A una solución de A (16.56 g, 98.8 mmol) en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (150 mL) se agregó  $\text{SOCl}_2$  (35.26 g, 296.4 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. El solvente se eliminó en vacío y el sólido blancuzco obtenido se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

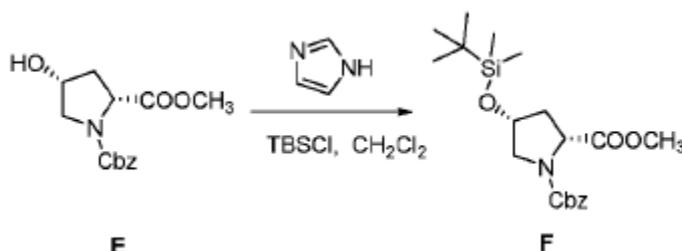
15 Síntesis de 4-hidroxipirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2R,4R)-1-bencil 2-metilo



20 A una solución de D (17.94 g, 98.8 mmol) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10.5 g, 98.8 mmol) en THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (150 mL/50 mL) se agregó CbzCl (20.2 g, 118.56 mmol) a  $0^\circ\text{C}$  y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se filtró a través de papel de filtro y el filtrado se concentró. Se agregó agua (200 mL) y el producto se extrajo con EtOAc (100 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, Éter de petróleo /EtOAc=5/1-2/1) para conseguir el producto deseado (7.4 g, 27%) como un aceite amarillo claro. LC-MS: 279.9 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

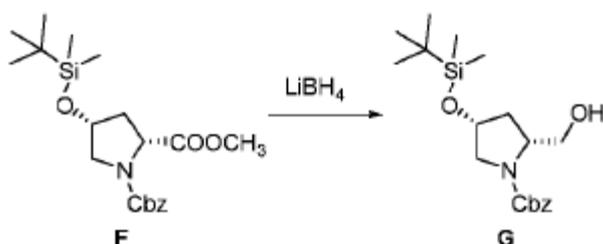
Síntesis de 2-metil 4-((tert-butildimetilsilil)oxi)pirrolidina-1,2-dicarboxilato de (2R,4R)-1-bencilo

25



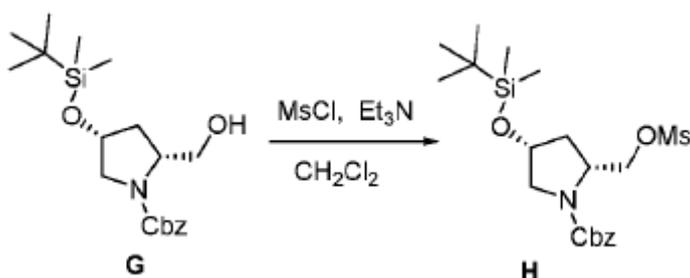
5 A una solución de E (7.4 g, 26.5 mmol) en diclorometano (70 mL) se agregó imidazol (3.6 g, 53 mmol). TBSCl en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) se agregó a la solución a  $0^\circ\text{C}$  y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua (200 mL), solución salina (200 mL) y la capa orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y se concentró para conseguir el producto crudo (10.4 g) como aceite amarillo claro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. LC-MS: 415.9 ( $[\text{M}+23]^+$ ).

Síntesis de 4-(tert-butildimetilsililoxi)-2-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de (2R,4R)-bencilo



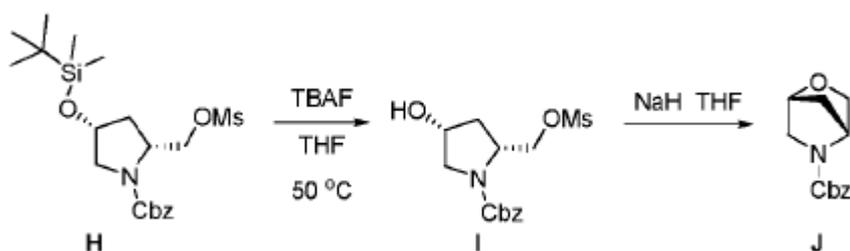
10 A una solución de F (10.4 g, 26.5 mmol) en THF anhidro (150 mL) se agregó  $\text{LiBH}_4$  (0.92 g, 42.4 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ , la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se sometió a partición contra  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) y el producto se extrajo con EtOAc (100 mL x 3). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (100 mL), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se concentraron y el residuo obtenido se purificó mediante columna de gel de sílice (éter de petróleo/EtOAc=100/0-60/10) para conseguir producto deseado (8.84 g, 91%) como aceite amarillo claro. LC-MS: 365.9 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

15 Síntesis de 4-(tert-butildimetilsililoxi)-2-((metilsulfonilo)xi)-Ometilpirrolidina-1-carboxilato de (2R,4R)-bencilo



20 A una solución de G (8.32 g, 22.8 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (4.6 g, 45.6 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ , se agregó MsCl (3.13 g, 27.3 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2h. La reacción luego se sometió a partición contra  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL), se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL x 3), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (100 mL), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para dar el producto crudo (10.11 g, 100%), que se utilizó directamente en la siguiente etapa. LC-MS: 443.8 ( $[\text{M}+1]^+$ ).

Síntesis de 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano-5-carboxilato de (1R,4R)-bencilo

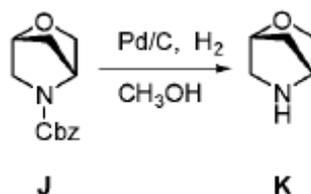


25 A una solución de H (10.11 g, 22.8 mmol) en THF (200 mL) se agregó TBAF (23.8 g, 91.2 mmol), y la mezcla se calentó a  $50^\circ\text{C}$  durante 3 h. Se agregó NaH (1.37 g, 34.2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se concentró para eliminar THF, luego se diluyó con EtOAc y se sometió a partición contra agua. La capa acuosa se extrajo con EA (100 mL x 3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (100 mL), se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron, se concentraron y se purificaron mediante columna de gel de sílice (Éter de

30

petróleo/ EtOAc = 10:1 a 5:1) para conseguir el producto (4.3 g, 81%) como aceite amarillo claro. LC-MS: 233.9 ( $[M+1]^+$ ).

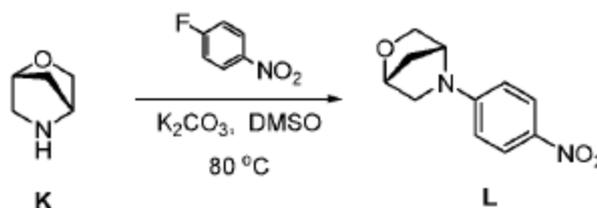
Síntesis de (1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano



5

A una solución de J (2 g, 8.6 mmol) en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (20 mL) se agregó Pd/C (0.2 g), la mezcla se agitó bajo balón de  $\text{H}_2$  a  $50^\circ\text{C}$  durante 4 h. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y el filtrado se concentró para conseguir el producto crudo (1.1 g, 100%) como aceite incoloro, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. LC-MS: 100.5 ( $[M+1]^+$ ).

10 Síntesis de (1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano

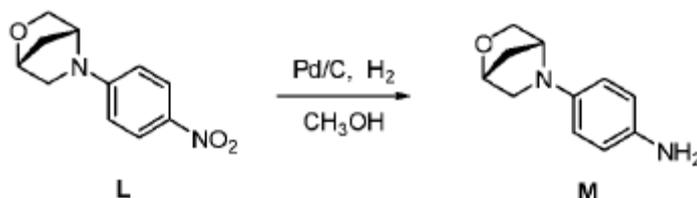


15

A una solución de K (0.85 g, 8.6 mmol) en DMSO (30 mL) se agregó 1-fluoro-4-nitrobenceno (1.46 g, 10.32 mmol) y carbonato de potasio (1.43 g, 10.32 mmol), la mezcla se calentó a  $80^\circ\text{C}$  y se agitó durante 4 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL), la mezcla se extrajo con EA (50 mL x 3), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron para conseguir un sólido amarillo, que se lavó con 2-metoxi-2-metilpropano (10 mL) para conseguir el producto (1.4 g, 74% de J) como un sólido amarillo. LC-MS: 221 ( $[M+1]^+$ ).

Síntesis de 4-((1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)anilina

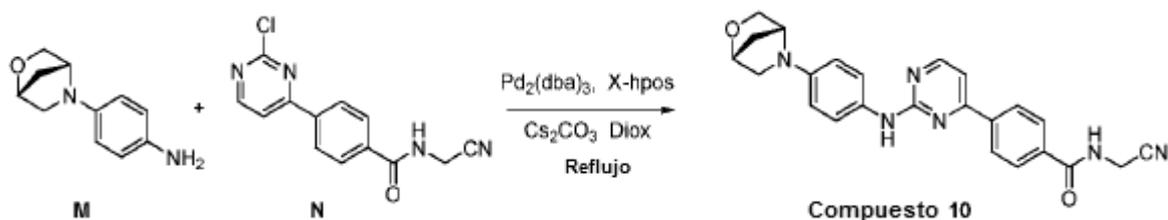
20



25

A una solución de L (1.31 g, 6.0 mmol) en  $\text{CH}_3\text{OH}$  (30 mL) se agregó Pd/C (10%, 0.13g), la mezcla se agitó bajo una atmósfera de  $\text{H}_2$  durante 4 h. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de una almohadilla de Celita y el filtrado se concentró para conseguir producto crudo (1.01 g, 88.6%) como un sólido marrón, se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. LC-MS: 191.0 ( $[M+1]^+$ ).

Síntesis de 4-(6-((4-((1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil) benzamida

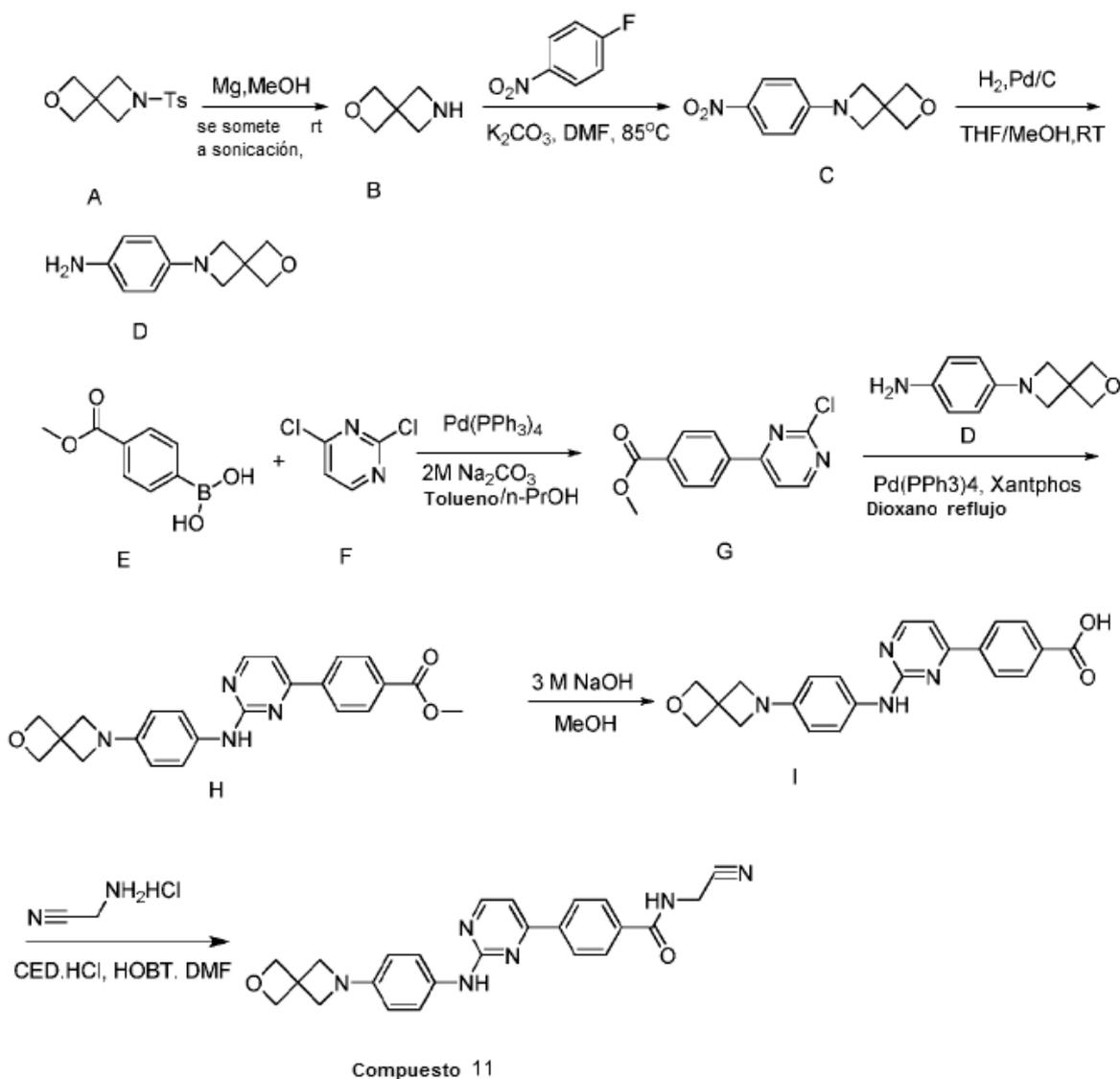


A una solución de M (293 mg, 2.2 mmol) y N (420 mg, 2.2 mmol) en Dioxano (60 mL), se agregó  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (200 mg, 0.22 mmol), X-phos (104 mg, 0.22 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1.61 g, 4.4 mmol) bajo  $\text{N}_2$ , la mezcla se calentó a  $100^\circ\text{C}$  y se agitó durante 6 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, y se agregó EA (50 mL). La mezcla resultante se filtró a través de papel de filtro para eliminar el sólido y el filtrado se sometió a partición contra agua  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL). La capa acuosa se extrajo con EA (50 mL x 3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtraron y se concentraron y se purificaron mediante columna de gel de sílice (Éter de petróleo /EtOAc=1/1----- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ =50/1) para conseguir el producto deseado (123 mg, 13.1%) como un sólido amarillo. LC-MS: 441.2 ( $[\text{M}+1]^+$ )

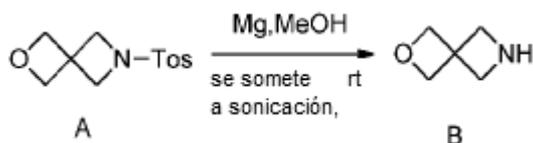
- 5
- 10  $^1\text{H}$ -RMN(400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.37 (s, 1 H), 9.34 (t, J = 5.2 Hz, 1 H), 8.50 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 8.25 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.36 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 6.61 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.58 (s, 1 H), 4.49 (s, 1 H), 4.35 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.70 (Abq, J = 7.2 Hz,  $\Delta v$ =22 Hz, 2H), 3.49 (dd, J1 = 1.2 Hz, J2 = 9.2 Hz, 1 H), 2.92 (d, J = 9.6 Hz, 1 H), 1.93 - 1.80 (m, 2H).

Ejemplo 11- Síntesis del compuesto 11

15

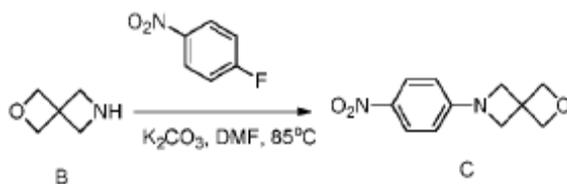


## Síntesis de B



- 5 Se agregó Mg (4.84 g, 0.20 mol) a una mezcla del compuesto A (7.3g, 28.8 mmol) en MeOH (500 mL) y se sometió a sonicación durante 1 h. Casi todo el solvente se eliminó bajo presión reducida de la mezcla de reacción gris para dar un residuo gris viscoso que se diluyó con éter (500 mL) y se agitó durante 1 h. Se agregó decahidrato de sulfato de sodio (15.00 g) y la mezcla gris clara resultante se agitó vigorosamente durante 30 mins. Los sólidos se eliminaron mediante filtración y la torta de filtro se lavó con éter, el filtrado se concentró para dar un aceite (1.50 g, 53 %). Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. TLC:  $R_f=0.02$  (gel de sílice, acetato de etilo: éter de petróleo = 1:1, v/v)
- 10

## Síntesis de C

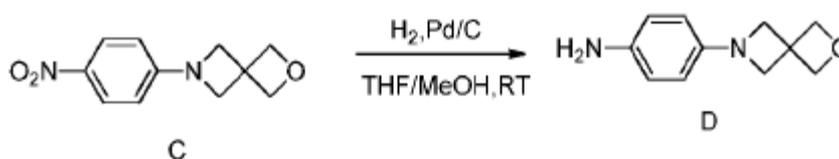


Una solución de B (1.5 g, 15.1 mmol), 1-fluoro-4-nitrobenzene (2.10 g, 15.1 mmol) y  $K_2CO_3$  (2.50 g, 18 mmol) en THF seco (30 mL) se calentó a reflujo durante 2 h. El TLC mostró que se consumió completamente el 1-fluoro-4-nitrobenzene. Se permitió que la mezcla de reacción se enfriara a temperatura ambiente y se concentró bajo presión reducida. El residuo se vertió en agua y se extrajo con DCM (3\*50 mL). Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con solución salina, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna flash (éter de petróleo/EtOAc, 50/1 a 10/1, v/v) para dar un sólido amarillo (1.15 g, 36 %). La estructura se confirmó por espectro de H-RMN.

TLC:  $R_f=0.2$  (gel de sílice, acetato de etilo: éter de petróleo = 1: 5, v/v)

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.11 (d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 6.32 (d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 4.89 (s, 4H), 4.22 (s, 4H).

Síntesis de D

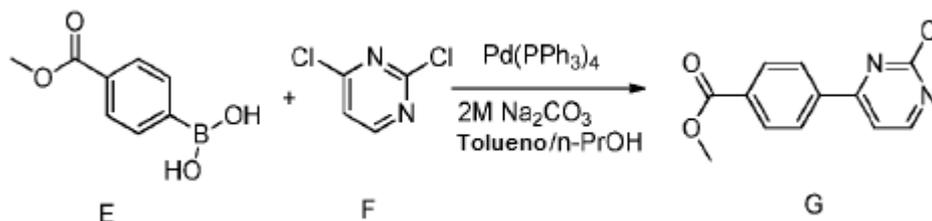


Una solución de C (1.50 g, 6.8 mmol) y 10% de Pd/C (90 mg) en una mezcla de MeOH (20 mL) y THF (20 mL) se colocó bajo una atmósfera de  $H_2$  y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El TLC mostró que el compuesto de C se consumió completamente. El catalizador se eliminó mediante filtración a través de celita y la torta de filtro se lavó con MeOH. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía para dar un sólido amarillo (1.05 g, 81 %). La estructura se confirmó por espectro de H-RMN.

TLC:  $R_f=0.2$  (gel de sílice, acetato de etilo: éter de petróleo =1: 2, v/v)

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 6.65 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 6.36 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 4.83 (s, 4H), 3.93 (s, 4H).

Síntesis de G

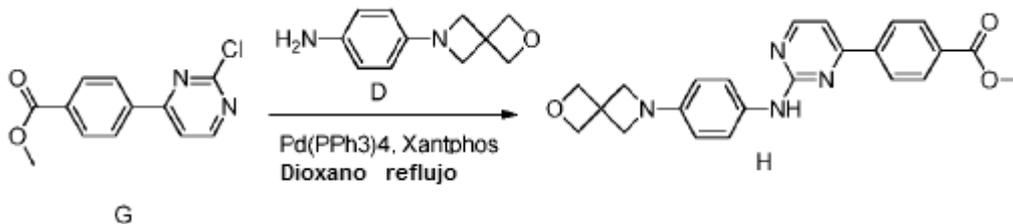


A una mezcla de E (1.00 g, 5.55 mmol) y F (1.65 g, 11.11 mmol) en una mezcla de tolueno (20 mL), n-PrOH (6.5 mL) y  $Na_2CO_3$  2M (5 mL) se agregó  $Pd(PPh_3)_4$  (0.65 g, 0.056 mmol). La reacción se agitó bajo nitrógeno y se calentó a reflujo durante 24 horas. El TLC mostró que el compuesto de E se consumió completamente. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una mezcla de  $H_2O$  y EtOAc. Esta mezcla se filtró a través de celita y se lavó con EtOAc. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL\*3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (DCM/Me-OH, 100:0 a 98:2, v/v) para dar el producto como un sólido blanco (800 mg, 61%). La estructura se confirmó por espectro de LC-MS.

TLC:  $R_f = 0.5$  (gel de sílice, éter de petróleo /acetato de etilo =10/1, v/v)

LC-MS:  $[M+1]^+$ : 249.1/251.1=3/1

Síntesis de H



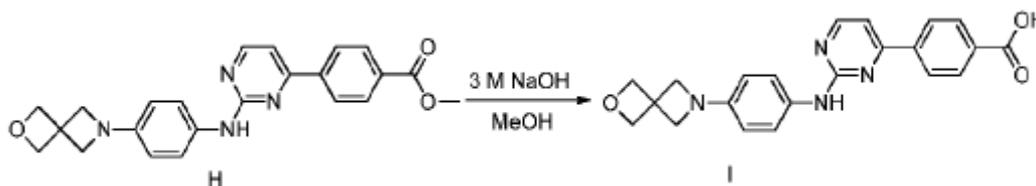
5 A una mezcla agitada de G (800 mg, 3.23 mmol, D (675 mg, 3.23 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (2.09 g, 6.42mmol) en dioxano (30 mL) se agregó Xantphos (186 mg, 0.32 mmol) y  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (372 mg, 0.32mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 16 hs. El TLC mostró que el compuesto E se consumió completamente. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$  y EtOAc. Esta mezcla se filtró a través de celita y se lavó con EtOAc. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (50 mL \*3) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (DCM:Me-OH=100:1/50:1) para dar un compuesto viscoso (680 mg, 52%) La estructura se confirmó por espectro de LC-MS y el LCMS mostró que contenía poca impureza. Se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

TLC:  $R_f = 0.5$  (gel de sílice, éter de petróleo :/acetato de etilo = 1/1, v/v)

LC-MS:  $[\text{M}+1]^+ : 403.0$

Síntesis de H

15

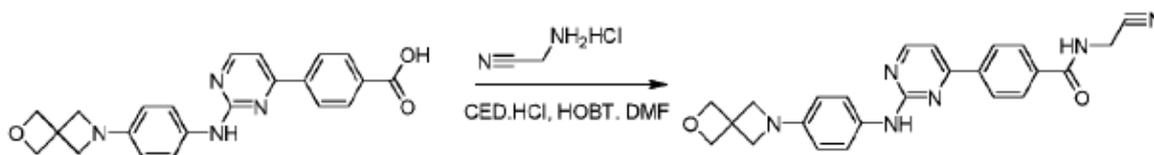


20 Una solución de H (650 mg, 1.61 mmol) en MeOH (8 mL) y NaOH 3 M (8 mL) se calentó a  $70^\circ\text{C}$  durante 2 h. El TLC mostró que el compuesto de H se consumió completamente. El solvente orgánico se eliminó en vacío y la solución acuosa que permaneció se vertió en agua y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se desechó y el pH de la solución acuosa restante se ajustó a  $\text{pH}=5$  con HCl 2N (ac). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El precipitado que se formó se recolectó mediante filtración se lavó con agua y se secó en vacío para dar un sólido gris (230 mg, 37%). La estructura se confirmó por espectro de LC-MS.

TLC:  $R_f = 0.4$  (gel de sílice=DCM/MeOH=15/1, v/v)

LC-MS:  $[\text{M}+1]^+ : 389.0$

25 Síntesis del compuesto 11



Compuesto 11

30 A una solución de I (220 mg, 0.57 mmol) y clorhidrato de 2-aminoacetonitrilo (104mg, 1.13 mmol) en DMF (5 mL) se agregaron TEA (434 mg, 3.39 mmol) HOBT (91 mg, 0.68 mmol) y EDC.HCl (239 mg, 1.24 mmol). La mezcla de reacción se agitó y se calentó a  $100^\circ\text{C}$  durante 2 h. El TLC mostró que se consumió la mayoría de I y la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en agua (10 mL) y se extrajo con DCM (3\*20 mL). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con solución salina, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y

## ES 2 644 606 T3

se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (DCM:MeOH=100:1/50:1) para dar un sólido amarillo (123 mg, 51% de rendimiento). La estructura se confirmó por LC-MS y espectro de H-RMN.

TLC:  $R_f$  = 0.5 (gel de sílice, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1/15 v/v)

LC-MS: [M+1]<sup>+</sup>:427

- 5 <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm): 9.41 (s, 1 H), 9.35 (t, J=5.2 Hz, 1 H), 8.51 (d, J=5.2 Hz, 1H), 8.26 (d, J=8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.58 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J=4.8 Hz, 1H) 6.44 (d, J=8.8 Hz, 2H), 4.73 (s, 4H), 4.36 (d, J=5.2 Hz, 2H), 3.94 (s, 4H).

Análisis del Compuesto

Se adquirieron datos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN en un espectrómetro de RMN Bruker AV-300 AVANCE.

- 10 LC-EI-MS y EI-MS

Parámetros generales:

Los datos de CL-EM-EI y EI-MS se adquirieron en un Waters 2795 Alliance HPLC acoplado a un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 y Espectrómetro de Masas de impacto electrónico TMD con Integridad que opera bajo control del software Waters Millennium<sup>32</sup> versión 4.0 con los ajustes descritos a continuación.

- 15 Parámetros del espectrómetro de masas:

Flujo de helio de aproximadamente 0.36 L/min.; modo de adquisición configurado para analizar; velocidad de muestreo de 1 espectros/seg; temperatura de la fuente 200°C; temperatura de nebulizador 80°C; temperatura de región de expansión 75°C; rango de masas m/z 100 a 550, m/z 100 a 650 o m/z 100-700 según se requiera.

Parámetros de HPLC

- 20 Los parámetros de LC-MS fueron como se describió para cada uno de los métodos descritos a continuación. Las muestras EI-MS se inyectaron y se analizaron con columna presente, con un índice de flujo de solvente de 0.25 mL/min.

Método A1 (LC-EI-MS)

Gradiente de Solvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	% de (ácido fórmico ac. al 0.5%)	Curva
0	90	0	10	-
0.5	90	0	10	6
7.5	0	90	10	6
10.5	0	90	10	6
11.5	90	0	10	6
14.5	90	0	10	6

- 25

Índice de flujo: 0.25 mL/min.

Columna: una de

- Alltima HP C<sub>18</sub> 2.1 x 150 mm, 5 micras
- XTerra MS C<sub>18</sub>, 3.0 x 100 mm, 3.5 micras

- 30 • XBridge C<sub>18</sub>, 3.0 x 100 mm, 3.5 micras

Método A2 (LC-EI-MS)

## ES 2 644 606 T3

### Gradiente de Solvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva
0	90	10	-
7	0	100	6
9	0	100	6
10	90	10	6
13	90	10	6

Índice de flujo: 0.25 mL/min

Columna: una de

- Alltima HP C<sub>18</sub> 2.1 x 150 mm, 5 micras
- 5 • XTerra MS C<sub>18</sub>, 3.0 x 100 mm, 3.5 micras
- XBridge C<sub>18</sub>, 3.0 x 100 mm, 3.5 micras

LC-ESI-MS

Parámetros generales:

- 10 Los datos de LC-ESI-MS se adquirieron en un Waters 2695Xe HPLC acoplado a un Detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 y Espectrómetro de Masas Waters ZQ que opera bajo condiciones de ionización de electropulverizador con software Masslynx versión 4.1 con los ajustes descritos a continuación.

Parámetros de espectrómetro de masas

Rango de masas:	m/z 100 a 650
Tiempo de exploración:	0.5
Inter exploración de retardo:	0.1
Gas de desolvatación:	500 L/h de N <sub>2</sub>
Gas de cono:	100 L/h de N <sub>2</sub>
Temperatura de desolvatación:	400°C
Temperatura de Fuente:	120°C
Voltaje de cono:	30 V para el modo positivo ESI, o -45 V para el modo negativo ESI

---

Parámetros de HPLC:

Fueron uno de los siguientes conjuntos de condiciones descritas a continuación.

---

- 15 Método B

### Gradiente de Solvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva
--------	------------------	----------	-------

## ES 2 644 606 T3

0	90	10	1
5	0	100	6
6	0	100	6
7	90	10	6
10	90	10	6

Índice de flujo : 0.25 mL/min.

Columna: XTerra MS C<sub>18</sub>, 2.1 x 50 mm, 3.5 micras

### Método C

#### Gradiente de Solvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	% de ácido fórmico (ac.) al 0,5%	Curva
0	90	0	10	1
0.5	90	0	10	1
5.5	0	90	10	1
7.5	0	90	10	6
8.5	90	0	10	6
11.5	90	0	10	6

Índice de flujo: 0.25 mL/min.

Columna: XTerra MS C<sub>18</sub>, 2.1 x 50 mm, 3.5 micras

### 5 Método D

#### Gradiente de Solvente:

Tiempo	% de agua MilliQ	% de ACN	Curva
0	90	10	1
10	0	100	6
12	0	100	6
13	90	10	6
16	90	10	6

Índice de flujo : 0.25 mL/min.

Columna: XTerra MS C<sub>18</sub>, 3.0 x 100 mm, 3.5 micras

### Ejemplo 12 – Cribado de enzimas

#### Protocolo de ensayo

Se realizaron ensayos de quinasa con base en el método reportado por Anastassiadis, T; et al Nature Biotechnology (2011); 29 (11); p1039-p1045 (doi: 10.1038/nbt.2017).

#### Resultados

Los datos de IC50 se muestran en la Tabla 2.

5

Compuesto No	JAK1		JAK2		JAK3		TYK2	
	Datos 1	Datos 2						
1	224.50	215.20	108.00	102.60	213.40	194.00	38.01	34.98
2	30.64	37.92	22.20	24.48	41.79	44.80	5.09	5.65
3	32.27	41.68	47.01	44.99	80.06	82.42	6.83	7.30
4	28.83	28.57	29.35	29.08	92.29	80.80	5.22	6.17
5	10.09	10.18	30.04	25.95	60.92	56.31	0.69	0.91
6	17.53	19.76	14.22	14.05	33.41	32.70	2.94	2.14
7	31.54	29.18	30.31	34.03	60.88	50.75	4.87	4.29
8	56.90	35.72	43.54	46.40	79.32	78.46	9.98	9.98
9	22.37	21.68	11.05	13.44	12.83	14.00	8.07	7.40
10	16.03	15.94	16.98	16.76	22.06	27.01	4.31	2.58
11	32.83	47.37	10.55	10.76	33.76	26.25	9.47	8.54

Los compuestos de mayor interés son los compuestos 5, 6 y 9.

#### Ejemplo 13 – Cribado celular

10 El principio del ensayo celular se basa en el método descrito por Daley y Baltimore (Daley and Baltimore; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85(23):9312-6). En este ensayo basado en células, las células Ba/F3 dependiente de IL3 se transforman mediante transfección de un gen de quinasa humana recombinante y a su vez las células modificadas son dependientes de la actividad de quinasa recombinante para la supervivencia y proliferación. Los efectos que tienen los compuestos de prueba sobre la proliferación se evalúan a través de lecturas convencionales, tales como ensayos de Alamar Blue y MTT de recambio metabólico.

#### 15 Ejemplo 14- Clasificador de células activadas con fluorescencia (FACS)

Análisis de citometría de flujo con multiparámetro intracelular de fosforilación STAT 5.

20 La estirpe de células eritroleucémicas humanas, HEL 92.1.7 (ATCC, TIB-180), se cultiva en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10% suplementado con piruvato de sodio 1 mM. Para la determinación fósforo-STAT 5, las células HEL se cultivan en RPMI 1640 + 1% de FCS durante 18 horas a 37°C y 2 X 10<sup>5</sup> células por punto de ensayo se exponen a compuestos de DMSO/prueba durante 2 horas a 37°C. Las células se centrifugan a 1300 rpm durante 3 minutos y se fijan en paraformaldehído (concentración final al 2%) durante 15 minutos a 37°C. Después de centrifugación, las células se permeabilizaron en metanol al 90% a 4°C durante 30 minutos. Después de tres lavados en PBS-FCS al 2%, se realiza tinción como sigue utilizando control de isotipo de inmunoglobulina de ratón conjugada con ficoeritrina BD PharMingen (Cat. No. 551436 y anticuerpo IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado con ficoeritrina a STAT 5 (Y694) (Cat.No. 612567). La tinción procede durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, seguida por 3 lavados en PBS-FCS al 2%. Las células luego se resuspendieron en 800 µL de PBS-FCS para análisis FACS. La citometría de flujo se realiza utilizando un Sistema Beckman Cell Lab Quanta SC con 3 capacidades de dispersión de color y laterales. El análisis de datos se realiza con software de análisis de CXP (versión 2.2). La intensidad de fluorescencia media (MFI) se utiliza para determinar las veces de cambio luego del tratamiento de células con compuestos inhibidores específicos, calculados como la relación  $MFI_{estimada}/MFI_{no\ estimada}$  para el canal de fluorescencia de anticuerpo fosfoespecífico (FL2)

#### Ejemplo 15 -. Transferencias Western

## Experimento 1

## Metodología

5 La estirpe de células pro-B de murino BaF3 se mantiene de forma rutinaria en medio RPMI 1640 que contienen 10% de FCS. En el día del experimento, las células se lavaron dos veces en PBS, y se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía 0.1% de FCS. Después de 2 horas de privación de suero, las células se trataron con la concentración deseada del compuesto 3, el compuesto de control, o vehículo solo (DMSO) durante 2 horas adicionales. Luego se agrega IL-3 de ratón a las células a una concentración final de 5 ng/ml durante 15 minutos. Después las células se colocaron sobre hielo y se lavaron dos veces en PBS enfriado en hielo. Los sedimentos celulares lavados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

10 Los sedimentos celulares se lisan en hielo en regulador RIPA, y los lisados se clarificaron por centrifugación (20.000 x g, 4°C, 5 min). La concentración de proteína de los lisados se determinó mediante el método Bradford, y se separaron cantidades iguales de proteína (60 µg/carril) por SDS-PAGE. La proteína se transfiere a continuación a PRVF, y realizó transferencia Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente STAT5 fosforilada en tirosina 694. La membrana luego se separa y se vuelve a sondear con un anticuerpo que reconoce la proteína total STAT5.

## Experimento 2

## Metodología

20 La estirpe celular eritroleucémica humana HEL 92.1.7 se mantiene de forma rutinaria en medio RPMI 1640 que contienen 10% de FCS. El día antes del experimento, las células se lavan dos veces en PBS, se resuspenden en RPMI 1640 que contenía FCS al 1%, y se cultivan durante la noche.

El día siguiente, las células se tratan con la concentración deseada del compuesto 3, el compuesto de control, o vehículo solo (DMSO) durante 2 horas. Luego las células se colocaron en hielo y se lavaron dos veces en PBS enfriado en hielo. Los sedimentos de las células lavadas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

25 Los sedimentos celulares se lisan en hielo en regulador RIPA, y los lisados se clarificaron por centrifugación (20.000 x g, 4°C, 5 min). La concentración de proteína de los lisados se determinó mediante el método Bradford, y se separaron cantidades iguales de proteína (60 µg/carril) por SDS-PAGE. La proteína se transfiere a continuación a PRVF, y se realizó transferencia Western utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la STAT5 fosforilada en tirosina 694. La membrana se peló y se volvió a sondear con un anticuerpo que reconoce la proteína STAT5 total.

## Ejemplo 16 – Evaluación del compuesto adicional

Los compuestos también se pueden probar en un modelo murino de enfermedad mieloproliferativa positiva a JAK2<sup>V617F</sup> (MPD)

Establecimiento de MPD positiva a JAK2<sup>V617F</sup>.

35 La médula ósea de ratones Balb/c machos tratados con 5-fluorouracilo puede estar infectada con un retrovirus JAK2-V617F-GFP y los receptores hembras se inyectan retroorbitalmente e irradian letalmente. A partir del día 21 los ratones se pueden monitorizar por inspección diaria y los recuentos de sangre se monitorizan dos veces por semana + FACS para células positivas a GFP. Se esperaría que pueda ocurrir un aumento en el hematocrito alrededor del día 28 y un aumento del recuento de leucocitos alrededor del día 40.

## 40 Tratamiento con compuestos

Grupo de intervención temprana: El tratamiento comenzaría el día 21 con el compuesto o portador dado por vía administración forzada oral (12 ratones en cada grupo). Los ratones se pueden monitorizar mediante inspección diaria y los recuentos de sangre se monitorizaría dos veces por semana + FACS de células positivas a GFP. Los animales se sacrificaron en el día 60 8-12 h después de la última dosis de fármaco. Los ratones moribundos o ratones con un recuento de glóbulos blancos sobre 200.000/nl o pérdida de peso >20% se pueden sacrificar antes.

50 Grupo de intervención tardía: Grupos de 3 ratones se pueden sacrificar en el día 29, 36, 43, 50 y 57 y la médula ósea y el bazo se pueden analizar para fibrosis de reticulina. El tratamiento puede comenzar con el compuesto o portador dado mediante administración forzada oral tan pronto se documenta fibrosis en 3/3 ratones. Los ratones se pueden monitorizar mediante inspección diaria y los recuentos de sangre dos veces por semana + FACS para células positivas a GFP. Los animales se pueden sacrificar después de 30 días de terapia 8-12 h después de la última dosis de fármaco. Los ratones moribundos o ratones con un recuento de glóbulos blancos sobre 200.000/nl o pérdida de peso >20% se pueden sacrificar antes. Los animales se pueden someter a necropsia.

## Análisis de tejidos y supervivencia

Se pueden determinar los pesos del hígado y bazo. Las secciones de tejido de médula ósea, hígado y bazo se pueden analizar por Tinción HE. La médula y el bazo también se pueden teñir con plata para evaluar la fibrosis de reticulina. Las células de bazo y médula ósea se pueden analizar por FACS para GFP, marcadores de linaje, fosforilación de JAK2 y STAT5. La sangre se puede recolectar por punción en el corazón y plasma se separan y congelan para la medición de concentración de fármaco. La supervivencia entre los grupos se puede comparar con el método de Kaplan-Meyer.

Evaluación de la actividad de los inhibidores de JAK2 en ensayos de formación de colonias de células hematopoyéticas humanas

Las células mononucleares periféricas de sangre de pacientes con MPD (predominantemente mielofibrosis) con y sin mutación de JAK2<sup>V617F</sup> (N = 10 para cada uno) y 5 controles normales (proveedor comercial) se pueden aislar mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll). Las células CD34+ se pueden seleccionar utilizando kits comerciales para enriquecer las células progenitoras. Las células CD34+ se pueden sembrar por triplicado en metilcelulosa suplementada con suero bovino fetal y citoquinas (+/- EPO). Después de incubación de las placas durante 2 semanas se puede evaluar la formación de colonias eritroides y mieloides en un microscopio invertido.

### 15 Cáncer

El efecto de los compuestos sobre la iniciación, progresión y metástasis del tumor se puede evaluar en modelos de eficacia en animales in vivo relevantes. Los modelos pueden ser modelos de xenoinjertos humanos de tumores en ratones inmunodeficientes, a partir de estirpes celulares tumorales humanas o preferiblemente de tumores humanos primarios o metastásicos. Otros modelos pueden ser xenoinjertos de tumores humanos que crecen en sitios ortotópicos, modelos de enfermedad diseminada y los modelos de tumores marcados o transgénicos. Los modelos también pueden incluir la resección quirúrgica del tumor primario y la evaluación de la enfermedad metastásica.

Se pueden seleccionar los modelos para asegurar que se expresa el fármaco molecular específico. Ejemplos de tumores que muestran la desregulación de la ruta JAK/STAT incluyen carcinoma de próstata, cáncer de mama, carcinoma de colon, que incluyen leucemia, linfoma, mieloma, tumores de ovario, melanoma, carcinoma de pulmón, glioma, tumores de células renal.

La eficacia se puede medir en estos modelos por diversos resultados dependiendo del tipo de tumor (sólido, leucemia o metastásico) y puede incluir la medida de la aparición del tumor, tasa de crecimiento del tumor, carga tumoral, retardo en el crecimiento del tumor, muerte de células tumorales, incidencia de metástasis, formación de imágenes del tumor e invasividad/metástasis por diversos enfoques, que incluyen células o reactivos marcados, supervivencia, angiogénesis, histopatología.

Los modelos de eficacia animal in vivo también pueden ser utilizados para la determinación de la aditividad o sinergia del efecto de los compuestos en combinación con otros fármacos,

El asma se limita a la especie humana, pero los modelos animales se utilizan a menudo para investigar aspectos particulares de esta enfermedad humana. Se ha demostrado que Las biopsias bronquiales y el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) recuperados de los pacientes con asma contienen un mayor número de células T activadas, células B, eosinófilos y mastocitos. Muchos pacientes con asma están sensibilizados y tienen anticuerpos específicos a inmunoglobulina E (IgE) para uno o más alérgenos inhalados. La atopia se considera como una de las principales causas del asma. En los individuos atópicos, la inhalación de alérgenos induce preferiblemente una respuesta de células T2 auxiliares (Th2). En la mayoría de los modelos actuales, los ratones se sensibilizan mediante inyección intraperitoneal (ip) de ovoalbúmina (OVA), a menudo junto con un adyuvante sesgado Th2, tal como alumbre. En el modelo clásico de ratón para el asma, los ratones C57/BL6 se sensibilizan activamente el día 0 mediante inyección ip de 10 mg de OVA absorbida en 1 mg de alumbre. A partir del día 14-21 los ratones están expuestos diariamente a OVA en aerosol durante un período de 30 minutos. En el día 22, la inflamación de las vías respiratorias es evidente. El fluido BAL recuperado de estos animales demuestran un aumento en el espacio peribronquiolar que consta de infiltrados celulares mixtos de células mononucleares y eosinófilos. Los anticuerpos IgE específicos de OVA se pueden mostrar en el suero de animales sensibilizados. La población de células mononucleares se compone principalmente de células de citoquinas IL-4 e IL-5 que secretan fenotipo Th2. La IL-4 promueve el cambio de isotipo de las células B hacia la síntesis de IgE y la IL-5 influye en la producción, maduración y activación de eosinófilos.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica de las articulaciones, inflamatoria poliarticular destructiva caracterizada por proliferación sinovial pasiva e infiltración subintimal de células inflamatorias. Aunque la etiología que queda por esclarecer, se reconoce generalmente que la AR es una enfermedad autoinmunitaria y la artritis es una consecuencia de la pérdida de tolerancia frente a un autoantígeno específico de cartílago. En este contexto, se ha establecido que los modelos animales evolucionan alrededor de la inducción de RA por un autoantígeno tal como 1. Artritis tipo II inducida por colágeno (CIA) y 2. una combinación de un antígeno de bacterias gram-ve (LPS) con un panel de 4 anticuerpos monoclonales (mAb). Un tercer modelo de la artritis es la artritis inducida por adyuvante (AIA), que se lleva a cabo principalmente en ratas. El mecanismo subyacente de la AIA sigue siendo controvertido. Sin embargo, se demostró que la proteína de choque térmico miobacteriana de 65 kD comparte una secuencia no

peptídica en la molécula de la proteína del núcleo de proteoglicanos, y sugiere que la AIA es también una enfermedad inducible por el antígeno autólogo.

5 En la AIA, se da a ratas Lewis de ocho semanas de edad adyuvante completo de Freund (CFA) preparado al suspender una emulsión de *Mycobacterium butyricum* muertas por calor en parafina líquida a 12 mg/ml. La artritis inducida por CFA puede ser estimulada por la inyección de 50 µl de CFA por vía intradérmica en emulsión, ya sea en la almohadilla de la pata o en la base de la cola. Desde el día 7 (inicio de la artritis), las ratas se examinan diariamente para puntuación de artritis clínica en una escala 0-4: 0, normal; 1, inflamación mínima; 2, inflamación media; 3, inflamación grave; y 4, severa y que no soporta peso. Para cada extremidad, la pata delantera media, la muñeca, las articulaciones de los dedos, la parte media del pie, el tobillo y las articulaciones de los dedos se puntúan dando una puntuación clínica máxima de 48 por rata. Los animales se sacrifican en día 17 y las patas traseras se amputan y se fijan en 7.4% de formalina. Después de descalcificación e incorporación en parafina, las extremidades se seccionan en un plano sagital medio, se tiñen con eosina y hematoxilina y se examinan microscópicamente para la formación de pannus (cartilago y erosión ósea y destrucción), vascularización (formación de vasos sanguíneos mediante tinción con CD31) e infiltración de células mononucleares (T, B y macrófagos).

15 En CIA, se utilizan ratones DBA/1 que llevan haplotipo MHC H-2<sup>q</sup> ya que son más susceptibles a CIA. En general se utiliza, el colágeno heterólogo, ya que son más inmunogénicos/artoéuticos que el colágeno de tipo II homólogo. Los ratones se cebaron con una emulsión que consiste en colágeno de bovino tipo II y adyuvante completo de Freund en una relación 1:1 (concentración final=2 mg/ml). La emulsión (0.1 ml) se inyecta en la cola de cada ratón aproximadamente 1-2 cm de la base. Un bolo blanquecino debajo de la dermis debe ser visible. Un refuerzo de colágeno de tipo II (200 µg por ratón) se proporciona por vía intraperitoneal en PBS en el día 21. Los ratones altamente susceptibles a CIA (DBA/1) generalmente desarrollan artritis 4-5 semanas después del cebado inicial. Se puede observar artritis totalmente desarrollada que incluye patas rojas e hinchadas, 3-5 días después de aparición y la artritis inflamatoria activa persiste más de 3-4 semanas. Aunque la inflamación con el tiempo desaparece, el daño en las articulaciones como se ve en la anquilosis es permanente. La evaluación de los síntomas de CIA es esencialmente similar al modelo de AIA en el que a los signos clínicos se les asigna la puntuación clínica (0-4) en base a la gravedad de la enfermedad. También se pueden realizar mediciones histológicas en las articulaciones fijadas con formalina para evaluar erosión, infiltrados celulares e hiperplasia.

30 En artritis inducida por LPS-mAB combinada, se puede inducir una artritis severa y coherente en ratones mediante una combinación de cóctel de LPS y mAB que reconoce epítomos individuales agrupados dentro de un fragmento de péptido de 83 aminoácidos situado dentro de la región CB11 de colágeno de tipo II. Este modelo fue desarrollado en base a la hipótesis de que la toxina(s) bacteriana absorbida a través del tracto GI cumple una función sinérgica y patológica con niveles sub-artritogénicos de autoanticuerpos al colágeno de tipo II en la activación de AR. Las ventajas de este modelo son: 1. se induce rápidamente la artritis sincronizada (100%) dentro de los 7 días 2. se pueden utilizar una variedad de cepas de ratón como la administración de cóctel mAB con colágeno anti-tipo II que pasa el requisito para la generación de autoanticuerpos del anfitrión en el colágeno tipo II. Por lo tanto, se puede inducir la artritis en ratones que no poseen haplotipos MHC susceptibles a CIA y 3. facilidad de administración de mAB y LPS por cualquiera de las rutas IV e IP.

40 Las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) que incluyen enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC) representan un grupo de trastornos crónicos caracterizados por la inflamación del tracto gastrointestinal. La CD puede afectar cualquier parte del tracto digestivo, mientras que la UC solo afecta el colon y el recto. La UC provoca inflamación y úlceras por lo general en el colon sigmoide y el recto. Los infiltrados celulares son complejos y son evidentes citoquinas pro-inflamatorias en CD y UC.

45 Un modelo experimental de UC se establece en ratones Balb/C mediante la administración de sulfato de sodio dextrano (3% de DSS) aislado de *Leuconostoc* spp. en el agua potable. El experimento tiene un curso temporal relativamente corto (8 días) y los parámetros para la evaluación de la colitis incluyen la pérdida de peso corporal, consistencia de heces, hemorragia rectal, acortamiento de la longitud del colon, daño de cripta y análisis de citoquinas de los anillos del colon.

50 En CD, los ratones Balb/c se sensibilizaron en el día 0 con 2 x 50 µl de 5 mg/ml de dinitrofluobenceno (DNFB) por vía epicutánea en el abdomen y patas afeitadas en dos días consecutivos. El DNFB normalmente se solubilizó en acetona: aceite de oliva (4:1). En el día 5, los ratones se inocularon por vía intracolónica con 50 µl de ácido dinitrobenzeno sulfónico (DNS) a 6 mg/ml en 10% de etanol. Los ratones se sacrifican en el día 8. Los parámetros que se van a medir incluyen supresión de la cantidad total de células de sangre y tipos de células, proteasa de mastocitos de mucosa 1 (MMCP-1) en suero, el nivel de TNFα en homogeneizado de colon, consistencia de heces, permeabilidad vascular y cantidad de parches de colon. La cantidad de neutrófilos y mastocitos es indicativa de daño del colon y la afluencia celular también será evaluado mediante exámenes histológicos y microscópicos.

Ejemplo 17 - Análisis ex vivo en células de pacientes positivos a JAK2V617F

Para evaluar la actividad de los inhibidores de moléculas pequeñas de JAK2 se ha desarrollado un ensayo para cuantificar la actividad de la ruta JAK-STAT al medir el estado de fosforilación de la proteína STAT5 en dirección 3'. Después de la unión de ligando, un receptor de citoquina hematopoyética experimenta un cambio conformacional de

la proteína activadora JAK2 asociada. La JAK2 activada fosforila la porción intracelular del receptor de la formación de sitios de unión para el reclutamiento de las proteínas de señalización intracelulares. La STAT5 es una proteína que se reclutó para el complejo de receptor de citoquinas activado, donde se fosforila y luego se transloca al núcleo para regular la expresión de un conjunto de genes que median el crecimiento y diferenciación celular.

- 5 Se puede utilizar citometría de flujo intracelular para medir la tirosina fosforilada STAT5 (pYSTAT5) en poblaciones de células específicas mediante activación sobre marcadores de superficie hematopoyéticos de linaje específico. Esto es particularmente importante para la enfermedad mieloproliferativa positiva a JAK2V617F ya que el clon que contiene la mutación sólo forma una fracción variable de todas las células hematopoyéticas en la médula ósea. Se han seleccionado células eritroides para examen en este estudio ya que este linaje es hiperplásico en PV.

10 Métodos

Se recolecta médula ósea de la cresta ileal de pacientes con enfermedad mieloproliferativa positiva a JAK2V617F. Los ensayos de citometría de flujo se realizan en muestras de médula ósea frescas en el día del procedimiento de biopsia. Se recolectan células mononucleares de médula ósea mediante centrifugación en gradiente de densidad y luego se incubaron 0.75-1.0 célulasx10<sup>6</sup> con compuestos de prueba a diversas concentraciones durante una hora en RPMI libre de indicador a 37°C. Las células se estimularon máximamente con eritropoyetina durante 10 minutos y después se fijaron mediante adición de 4% de formaldehído directamente en el medio de cultivo. Después las células se permeabilizaron con metanol frío y después se agregan concentraciones óptimas de anticuerpos marcados con fluorescencia. Las células eritroides se seleccionan para medición de pYSTAT5 con base en la expresión de proteínas de la superficie celular (población CD45<sup>lo</sup>, CD71<sup>hi</sup>).

- 15
- 20 Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente especificación es solo con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se debe tomar como una admisión de que cualquiera o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o que eran del conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención tal como existía en Australia o en otro lugar antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

- 25 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción precedente de la invención, excepto cuando el contexto requiera de otra forma expresar idioma o implicación necesaria, la palabra “comprenden” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” se utiliza en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no excluye la presencia o adición de características adicionales en realizaciones adicionales de la invención.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> YM BioSciences Australia Pty Ltd

<120> COMPUESTOS BICÍCLICOS DE FENIL AMINO PIRIMIDINA Y USOS DE LOS MISMOS

<130> P065379EP

<140> 13809739.9

- 35 <141> 2013-06-26

<150> US 61/666,725

<151> 2012-06-29

<150> US 13/830,152

<151> 2013-03-14

- 40 <150> AU 2013201780

<151> 2013-03-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

- 45 <211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<223> Quinasa JAK2 j2h

<400> 1

Ser Gly Ala Phe Glu Asp Arg Asp Pro Thr Gln Phe Glu Glu Arg His  
 1 5 10 15

Leu Lys Phe Leu Gln Gln Leu Gly Lys Gly Asn Phe Gly Ser Val Glu  
 20 25 30

Met Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Gln Asp Asn Thr Gly Glu Val Val Ala  
 35 40 45

Val Lys Lys Leu Gln His Ser Thr Glu Glu His Leu Arg Asp Phe Glu  
 50 55 60

Arg Glu Ile Glu Ile Leu Lys Ser Leu Gln His Asp Asn Ile Val Lys  
 65 70 75 80

Tyr Lys Gly Val Cys Tyr Ser Ala Gly Arg Arg Asn Leu Lys Leu Ile  
 85 90 95

Met Glu Tyr Leu Pro Tyr Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Gln Lys His  
 100 105 110

5

ES 2 644 606 T3

Lys Glu Arg Ile Asp His Ile Lys Leu Leu Gln Tyr Thr Ser Gln Ile  
 115 120 125

Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Thr Lys Arg Tyr Ile His Arg Asp  
 130 135 140

Leu Ala Thr Arg Asn Ile Leu Val Glu Asn Glu Asn Arg Val Lys Ile  
 145 150 155 160

Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr  
 165 170 175

Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro Glu  
 180 185 190

Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe  
 195 200 205

Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu Lys Ser Lys Ser  
 210 215 220

Pro Pro Ala Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp Lys Gln Gly Gln  
 225 230 235 240

Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys Asn Asn Gly Arg Leu  
 245 250 255

Pro Arg Pro Asp Gly Cys Pro Asp Glu Ile Tyr Met Ile Met Thr Glu  
 260 265 270

Cys Trp Asn Asn Asn Val Asn Gln Arg Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ala  
 275 280 285

Leu Arg Val Asp Gln Ile Arg Asp Asn Met Ala Gly  
 290 295 300

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<223> Quinasa JAK1 j1h

<400> 2

ES 2 644 606 T3

Lys Asn Gln Pro Thr Glu Val Asp Pro Thr His Phe Glu Lys Arg Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Arg Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Glu  
 20 25 30  
 Leu Cys Arg Tyr Asp Pro Glu Asp Asn Thr Gly Glu Gln Val Ala Val  
 35 40 45  
 Lys Ser Leu Lys Pro Glu Ser Gly Gly Asn His Ile Ala Asp Leu Lys  
 50 55 60  
 Lys Glu Ile Glu Ile Leu Arg Asn Leu Tyr His Glu Asn Ile Val Lys  
 65 70 75 80  
 Tyr Lys Gly Ile Cys Thr Glu Asp Gly Gly Asn Gly Ile Lys Leu Ile  
 85 90 95  
 Met Glu Phe Leu Pro Ser Gly Ser Leu Lys Glu Tyr Leu Pro Lys Asn  
 100 105 110  
 Lys Asn Lys Ile Asn Leu Lys Gln Gln Leu Lys Tyr Ala Val Gln Ile  
 115 120 125  
 Cys Lys Gly Met Asp Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Tyr Val His Arg Asp  
 130 135 140  
 Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Glu Ser Glu His Gln Val Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Ala Ile Glu Thr Asp Lys Glu Tyr Tyr  
 165 170 175  
 Thr Val Lys Asp Asp Arg Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu  
 180 185 190  
 Cys Leu Met Gln Ser Lys Phe Tyr Ile Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe  
 195 200 205  
 Gly Val Thr Leu His Glu Leu Leu Thr Tyr Cys Asp Ser Asp Ser Ser  
 210 215 220  
 Pro Met Ala Leu Phe Leu Lys Met Ile Gly Pro Thr His Gly Gln Met  
 225 230 235 240  
 Thr Val Thr Arg Leu Val Asn Thr Leu Lys Glu Gly Lys Arg Leu Pro  
 245 250 255  
 Cys Pro Pro Asn Cys Pro Asp Glu Val Tyr Gln Leu Met Arg Lys Cys

ES 2 644 606 T3

260

265

270

Trp Glu Phe Gln Pro Ser Asn Arg Thr Ser Phe Gln Asn Leu Ile Glu  
 275 280 285

Gly Phe Glu Ala Leu Leu Lys  
 290 295

<210> 3

<211> 299

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<223> Quinasa JAK3 j3h

<400> 3

Ala Gln Leu Tyr Ala Cys Gln Asp Pro Thr Ile Phe Glu Glu Arg His  
 1 5 10 15

Leu Lys Tyr Ile Ser Gln Leu Gly Lys Gly Asn Phe Gly Ser Val Glu  
 20 25 30

Leu Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Ala His Asn Thr Gly Ala Leu Val Ala  
 35 40 45

Val Lys Gln Leu Gln His Ser Gly Pro Asp Gln Gln Arg Asp Phe Gln  
 50 55 60

Arg Glu Ile Gln Ile Leu Lys Ala Leu His Ser Asp Phe Ile Val Lys  
 65 70 75 80

Tyr Arg Gly Val Ser Tyr Gly Pro Gly Arg Pro Glu Leu Arg Leu Val  
 85 90 95

Met Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Cys Leu Arg Asp Phe Leu Gln Arg His  
 100 105 110

Arg Ala Arg Leu Asp Ala Ser Arg Leu Leu Leu Tyr Ser Ser Gln Ile  
 115 120 125

Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Ser Arg Arg Cys Val His Arg Asp  
 130 135 140

Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Glu Ser Glu Ala His Val Lys Ile  
 145 150 155 160

10

ES 2 644 606 T3

Ala Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu Asp Lys Asp Tyr Tyr  
 165 170 175

Val Val Arg Glu Pro Gly Gln Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro Glu  
 180 185 190

Ser Leu Ser Asp Asn Ile Phe Ser Arg Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe  
 195 200 205

Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Cys Asp Lys Ser Cys Ser  
 210 215 220

Pro Ser Ala Glu Phe Leu Arg Met Met Gly Cys Glu Arg Asp Val Pro  
 225 230 235 240

Ala Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu Leu Glu Glu Gly Gln Arg Leu Pro  
 245 250 255

Ala Pro Pro Ala Cys Pro Ala Glu Val His Glu Leu Met Lys Leu Cys  
 260 265 270

Trp Ala Pro Ser Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Ser Ala Leu Gly Pro  
 275 280 285

Gln Leu Asp Met Leu Trp Ser Gly Ser Arg Gly  
 290 295

<210> 4

<211> 296

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> característica\_misc

<223> Quinasa TYK2tyk2

<400> 4

ES 2 644 606 T3

Asn Arg Asp Ser Pro Ala Val Gly Pro Thr Thr Phe His Lys Arg Tyr  
1 5 10 15

Leu Lys Lys Ile Arg Asp Leu Gly Glu Gly His Phe Gly Lys Val Ser  
20 25 30

Leu Tyr Cys Tyr Asp Pro Thr Asn Asp Gly Thr Gly Glu Met Val Ala  
35 40 45

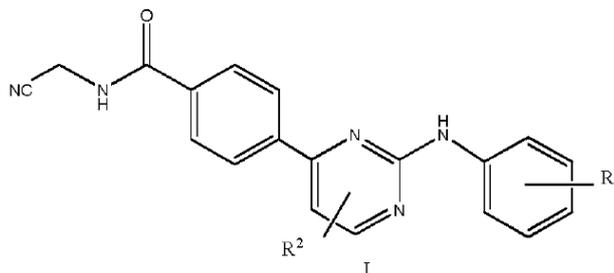
Val Lys Ala Leu Lys Ala Asp Cys Gly Pro Gln His Arg Ser Gly Trp  
50 55 60

ES 2 644 606 T3

Lys Gln Glu Ile Asp Ile Leu Arg Thr Leu Tyr His Glu His Ile Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Lys Gly Cys Cys Glu Asp Gln Gly Glu Lys Ser Leu Gln Leu  
 85 90 95  
 Val Met Glu Tyr Val Pro Leu Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Pro Arg  
 100 105 110  
 His Ser Ile Gly Leu Ala Gln Leu Leu Phe Ala Gln Gln Ile Cys  
 115 120 125  
 Glu Gly Met Ala Tyr Leu His Ala His Asp Tyr Ile His Arg Asp Leu  
 130 135 140  
 Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Asp Asn Asp Arg Leu Val Lys Ile Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Phe Gly Leu Ala Lys Ala Val Pro Glu Gly His Glu Tyr Tyr Arg  
 165 170 175  
 Val Arg Glu Asp Gly Asp Ser Pro Val Phe Trp Tyr Ala Pro Glu Cys  
 180 185 190  
 Leu Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Tyr Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly  
 195 200 205  
 Val Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Thr His Cys Asp Ser Ser Gln Ser Pro  
 210 215 220  
 Pro Thr Lys Phe Leu Glu Leu Ile Gly Ile Ala Gln Gly Gln Met Thr  
 225 230 235 240  
 Val Leu Arg Leu Thr Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Leu Pro Arg  
 245 250 255  
 Pro Asp Lys Cys Pro Cys Glu Val Tyr His Leu Met Lys Asn Cys Trp  
 260 265 270  
 Glu Thr Glu Ala Ser Phe Arg Pro Thr Phe Glu Asn Leu Ile Pro Ile  
 275 280 285  
 Leu Lys Thr Val His Glu Lys Tyr  
 290 295

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I



en la que

5 R<sup>1</sup> es un heterociclilo bicíclico sustituido o no sustituido, en el que el heterociclilo bicíclico tiene dos anillos conectados que contienen por lo menos un heteroátomo y que es un anillo bicíclico no aromático;

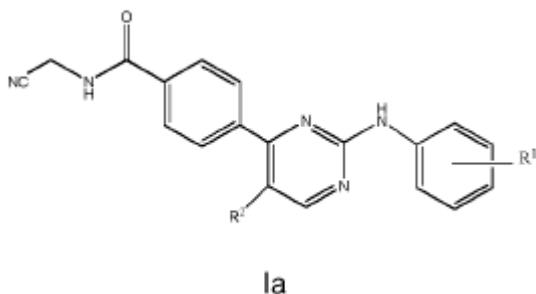
R<sup>2</sup> se selecciona de H, halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido, alcoxi C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido con CF<sub>3</sub>, CON(R)<sub>2</sub>, CN y CO<sub>2</sub>R; y

R se selecciona de H y alquilo C<sub>1-4</sub> sustituido o no sustituido;

10 en la que "sustituido" se refiere a un grupo que se sustituye con uno o más grupos seleccionados de alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, alquilarilo C<sub>1-6</sub>, arilo, halo, haloalquilo C<sub>1-6</sub>, halocicloalquilo C<sub>3-6</sub>, haloalquenilo C<sub>2-6</sub>, haloalquinilo C<sub>2-6</sub>, haloarilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, arilo, carboxi, haloalcoxi C<sub>1-6</sub>, haloalquenilo C<sub>2-6</sub>, haloalquinilo C<sub>2-6</sub>, haloarilo, oxo, nitro, nitroalquilo C<sub>1-6</sub>, nitroalquenilo C<sub>2-6</sub>, nitroarilo, azido, amino, alquilamino C<sub>1-6</sub>, alquenilamino C<sub>2-6</sub>, alquinilamino C<sub>2-6</sub>, arilamino, alquilacilo C<sub>1-6</sub>, alquenilacilo C<sub>2-6</sub>, alquilacilo C<sub>2-6</sub>, arilacilo, acilamino, aciloxi, aldehído, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilo, alquilsulfonilamino C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilamino, alquilsulfonilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilo, alquilsulfenilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfenilo, carboalcoxi, carboarilo, mercapto, alquiltio C<sub>1-6</sub>, ariltio, aciltio, y ciano,

o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula I tiene la fórmula Ia:



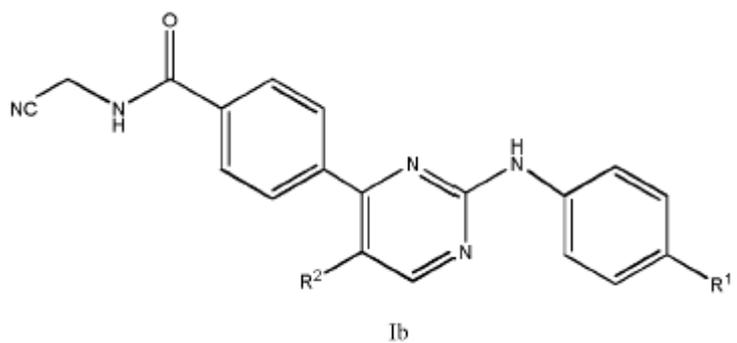
20

en la que

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se define en la reivindicación 1,

o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de la fórmula I tiene la Fórmula Ib



en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son como se define en la reivindicación 1,

o un enantiómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

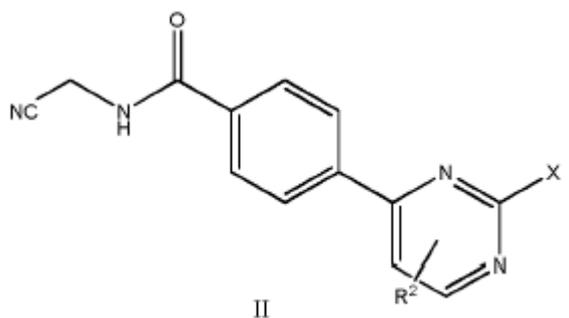
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de

- 5 4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.3]heptan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 4-(2-((4-(2-oxa-6-azaespiro[3.3]heptan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 (S)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.4]octan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 (R)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.4]octan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 (R)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.5]nonan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 10 (S)-4-(2-((4-(1-oxa-6-azaespiro[3.5]nonan-6-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 4-(2-((4-(1-oxa-7-azaespiro[3.5]nonan-7-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 4-(2-((4-(6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan-3-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 4-(2-((4-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida;  
 4-(2-((4-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida; y  
 15 4-(2-((4-((1R,4R)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)fenil)amino)pirimidin-4-il)-N-(cianometil)benzamida.

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los sustituyentes se seleccionan del grupo que consiste de alquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub>, alquino C<sub>2-6</sub>, alquilarilo C<sub>1-6</sub>, arilo, halo, oxo, haloarilo, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub>, arilo, carboxilo, amino, alquilalilo C<sub>1-6</sub>, arilalilo, acilamino, aciloxi, alquilsulfenilo C<sub>1-6</sub>, arilsulfonilo y ciano.

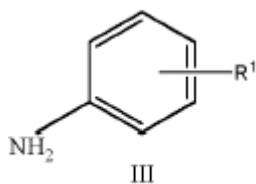
20 6. Un proceso para la preparación del compuesto de la fórmula I de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende

(i) acoplar un compuesto de la fórmula II



en la que

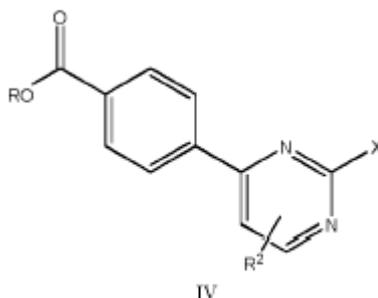
25 R<sup>2</sup> es como se define en la reivindicación 1 y X es un grupo saliente,  
 con un compuesto de la fórmula III



en la que

R<sup>1</sup> es como se define en la reivindicación 1; o

(ii) acoplar un compuesto de la fórmula IV

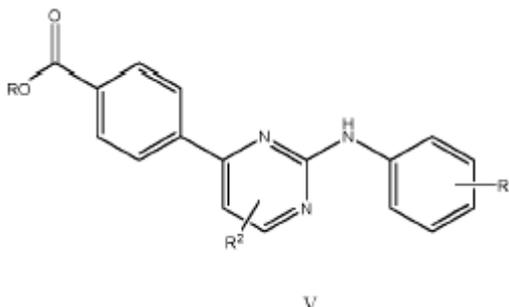


5

en la que

R<sup>2</sup>, X y R son como se definieron anteriormente,

con un compuesto de la fórmula III como se definió anteriormente para preparar un compuesto de la fórmula V



10

en la que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R son como se define en la reivindicación 1; y

acoplar el compuesto de la fórmula V como se definió anteriormente con



15

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que X en el compuesto de la fórmula II es cloro que luego se convierte en yodo antes de acoplarse con el compuesto de la fórmula III.

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.

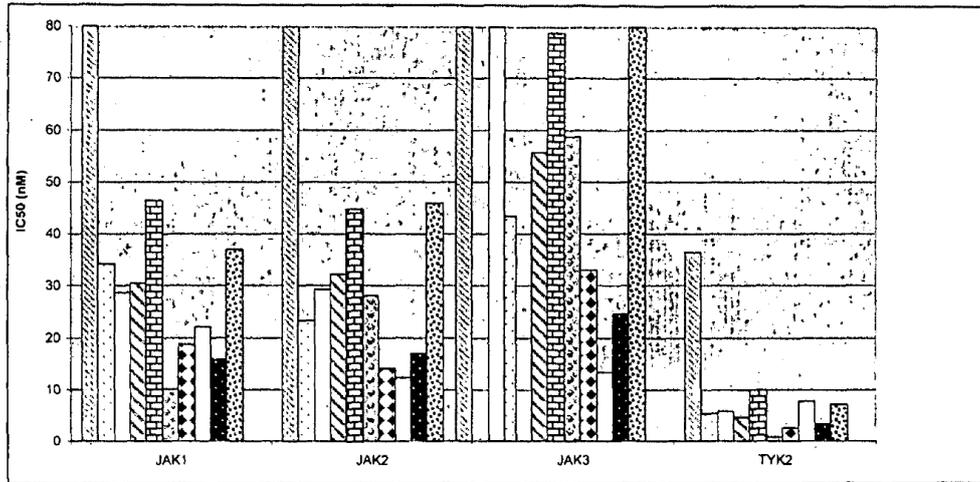
9. Un implante que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

20

10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad asociada a quinasa seleccionada de enfermedades inmunológicas e inflamatorias que incluyen trasplantes de órgano; enfermedades proliferativas que incluyen cáncer y enfermedades mieloproliferativas; enfermedades víricas; enfermedades metabólicas; y enfermedades vasculares.

11. El compuesto o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad asociada a quinasa es una enfermedad inmunológica o inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, polimialgia reumática, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y fibrosis pulmonar.
- 5 12. El compuesto o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad asociada a quinasa es una enfermedad mieloproliferativa seleccionada de policitemia vera, mielofibrosis primaria, trombocitemia, trombocitemia esencial, mielofibrosis idiopática, leucemia mielógena crónica, mastocitosis sistémica, leucemia neutrofílica crónica, síndrome mielodisplásico y enfermedad sistémica de mastocitos.





	1
	2
	4
	7
	8
	5
	6
	9
	10
	3

Fig. 2