

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 353**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/5025** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/US2013/058114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13762679 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2892899**

54 Título: **Inhibidores de JAK3 de imidazopiridazina y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias**

30 Prioridad:

**06.09.2012 US 201261697335 P**  
**14.03.2013 US 201361781074 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2018**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)**  
**Route 206 and Province Line Road**  
**Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**YANG, BINGWEI, VERA;**  
**BROWN, GREGORY, D.;**  
**GUPTA, SAMAYAMUNTHULA, VENKATA, SATYA,**  
**ARUN, KUMAR y**  
**PITTS, WILLIAM, J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 666 353 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**

Inhibidores de JAK3 de imidazopiridazina y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias

5

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere nuevos compuestos de pirrolopiridazina que son útiles como inhibidores de quinasas Janus (JAK), más particularmente JAK3. Esta invención también se refiere a los compuestos para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, y a las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos.

10

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos de pirrolopiridazina, los métodos de preparación de estos compuestos, y su uso en el tratamiento de dolencias en las que la modulación selectiva de la ruta de señalización JAK mediante la inhibición de las quinasas Janus (JAK), particularmente la quinasa JAK3, puede ser terapéuticamente beneficiosa.

15

Las quinasas Janus (JAK) pertenecen a la familia de proteínas tirosina quinasas no de receptores, y se sabe que son reguladores intracelulares fundamentales de la señalización de citoquinas mediante la modulación de la ruta JAK-STAT (véase, Murray, P.J., *Immunity*, 28:763 (2008)). Existen cuatro isoformas de JAK de mamífero conocidas que incluyen JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2.

20

Se ha demostrado que JAK3 tiene un papel específico en la señalización de un subconjunto de citoquinas conocido como la familia de citoquinas de la cadena gamma común que incluye las interleuquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. La deficiencia de JAK3 en roedores y seres humanos da como resultado un fenotipo de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (véase, Pesu, M. et al., *Immunol. Rev.*, 203:127 (2005)). Además, se sabe que JAK3 tiene una expresión limitado la expresión en células hematopoyéticas mientras que JAK1, JAK2 y TYK2 han demostrado expresarse de forma más ubicua. Como resultado de su papel específico en la regulación de la respuesta inmunitaria y su expresión localizada en las células linfoides, se ha reconocido que la inhibición de JAK3 es una estrategia prometedora para el desarrollo de agentes inmunosupresores novedosos y selectivos que pueden resultar útiles en la prevención del rechazo al trasplante y en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, tales como la psoriasis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, y lupus (véase, O'Shea, J.J. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(7):555 (2004)). Además, el inhibidor de JAK, CP-690.550 que potencialmente inhibe JAK3, se ha notificado que es eficaz en el tratamiento de artritis en modelos de roedores, y también en pacientes con artritis reumatoide (véase, Milici, A.J. et al., *Arthritis Res. & Therapy*, R14 (2008) y Coombs, J.H. et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 69:413 (2010)). Se ha sugerido que la eficacia clínica de CP-690.550 (Tofacitinib) puede estar relacionada con su capacidad para inhibir otros miembros de la familia JAK (véase Ghoreschi, K. et al., *J. Immunol.*, 186:4234 (2011)). Aunque JAK3 y JAK1 son ambos capaces de modular la cadena gamma común que induce la fosforilación de la señalización STAT, la inhibición de JAK1 también disminuye la señalización de citoquinas no de la cadena gamma común (por ejemplo, la señalización de IL-6). Por consiguiente, novedosos compuestos que inhiban la ruta JAK/STAT, más particularmente mediante inhibición selectiva de JAK3 y/o JAK1, pueden ser terapéuticamente útiles. Algunos inhibidores de JAK3 se han divulgado en solicitudes presentadas por el presente solicitante mediante el Tratado de cooperación en materia de patentes con los números PCT/US2012/029334, PCT/US2012/029366 y PCT/US2012/029337, y en el documento WO 2011/014817.

25

30

35

40

45

Debe indicarse que la isoforma JAK2 estrechamente relacionada, está clásicamente asociada con la producción de interferón- $\gamma$  y mediante la ruta de IL-12, pero también media en la señalización de importantes factores de crecimiento hematopoyéticos tales como la eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Como resultado, la inhibición de JAK2 puede dar como resultado efectos hematopoyéticos adversos tales como anemia, trombocitopenia y leucopenia generalizada.

50

Por lo tanto, novedosos compuestos que inhiban selectivamente JAK3 y/o JAK1 respecto de JAK2 pueden ser especialmente deseables para el tratamiento seguro de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias crónicas.

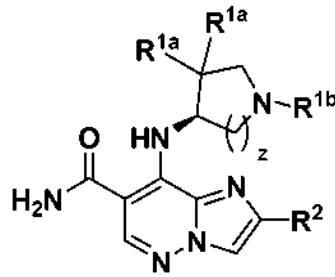
55

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona compuestos de fórmula I, composiciones farmacéuticas que utilizan dichos compuestos y el uso de dichos compuestos.

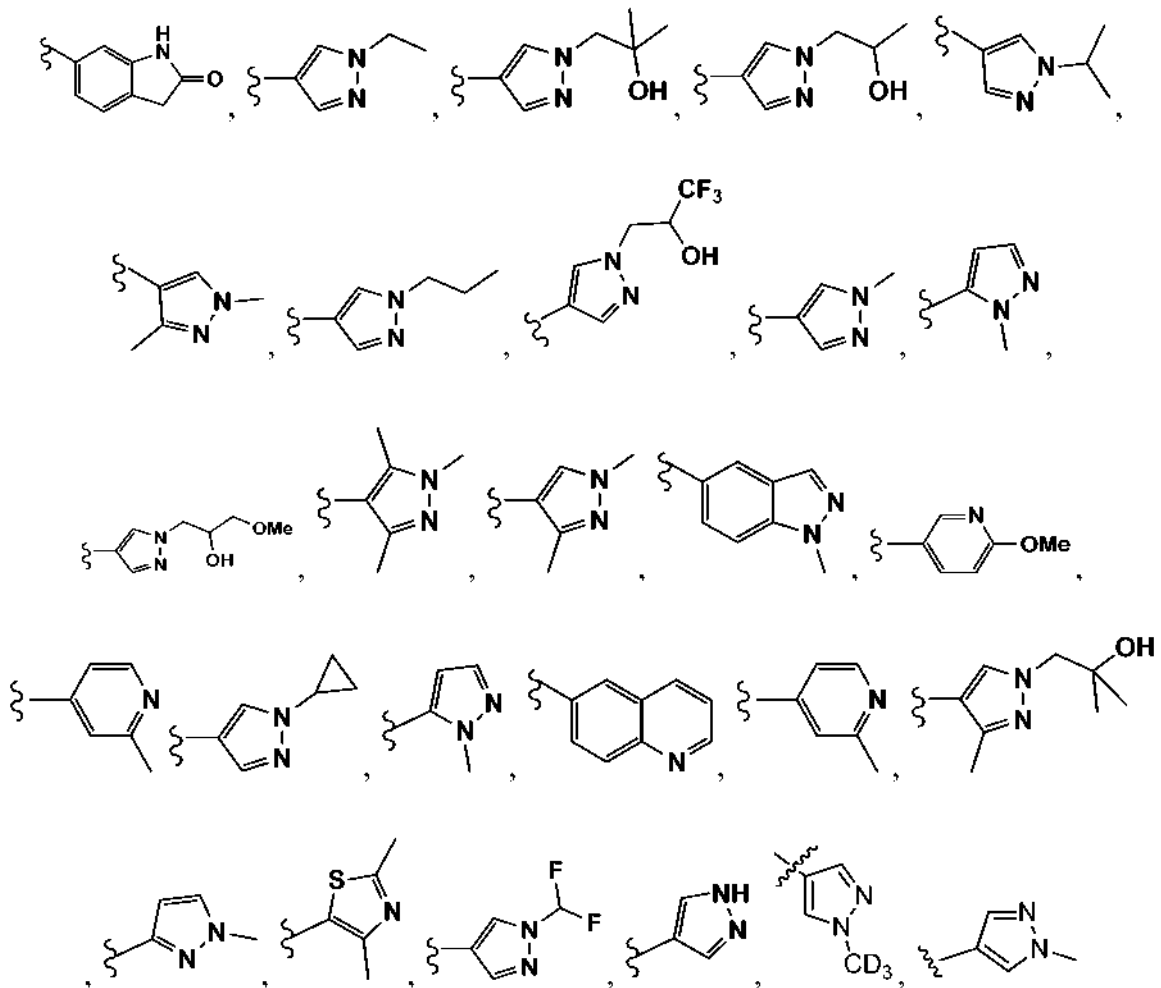
60

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan compuestos de fórmula (II)

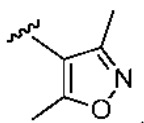


o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- 5  $R^{1a}$  es independientemente cada vez que aparece H, F, Cl, Br,  $-(CH_2)_rOR^b$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^a$ ,  $-(CH_2)_r$ -carbocíclico de 3-6 miembros sustituido con 0-2  $R^a$ ;  
 $R^{1b}$  es hidrógeno,  $-(CH_2)_rC(O)R^{1d}$ ,  $-(CH_2)_rC(O)OR^b$ ,  $-(CH_2)_rS(O)_2R^e$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^a$ , un  $-(CH_2)_r$ -heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y S(O)<sub>p</sub> sustituido con 0-2  $R^a$ ; o un  $-(CH_2)_r$ -heteroarilo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y S sustituido con 0-2  $R^a$ ;  
 10  $R^{1d}$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , haloalquilo  $C_{1-6}$ ,  $C(O)NR^cR^c$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , o  $(CH_2)_r$ -fenilo sustituido con 0-2  $R^a$ , un heterociclo de 4 a 10 miembros que contiene 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y S sustituido con 0-3  $R^a$ ;
- 15  $R^2$  se selecciona de entre:



y



$R^a$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-(CH_2)_rOR^b$ ,  $-(CH_2)_rNR^cR^c$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-1  $R^f$ , o haloalquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^b$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , o  $-(CH_2)_r$ -heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y  $S(O)_p$  sustituido con 0-1  $R^d$ ;

$R^c$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^d$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-OR^c$ , o alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^e$  es independientemente cada vez que aparece alquilo  $C_{1-6}$ ;

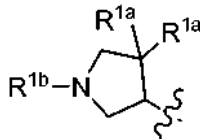
$R^f$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, halo, CN,  $SO_2$ -metilo, fenilo,  $NH_2$ ,  $NHCO$ -metilo, OH u  $OCH_3$ ;

r es 0, 1, 2, 3 o 4;

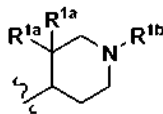
p es 0, 1 o 2; y

z es 1 o 2.

En una realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que  $R^1$  es



En otra realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), en la que  $R^1$  es



En otra realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

$R^{1a}$  es independientemente cada vez que aparece H o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^a$ ;

$R^{1b}$  es

i) hidrógeno,  $-(CH_2)_rC(O)R^{1d}$ ,  $-(CH_2)_rC(O)OR^b$ , o  $-(CH_2)_rS(O)_2R^e$ ;

ii) o alquilo  $C_{1-6}$ , piridilo, o piridazinilo, cada grupo sustituido con 0-2  $R^a$ ;  $R^{1d}$  es independientemente cada vez que aparece:

i) hidrógeno, haloalquilo  $C_{1-6}$ , o  $C(O)NR^cR^c$ ;

ii) alquilo  $C_{1-6}$ , ciclopropilo, ciclobutilo u oxetano, cada grupo sustituido con 0-2  $R^d$ ;

iii) o  $(CH_2)_r$ -fenilo sustituido con 0-2  $R^a$ ;

$R^a$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-(CH_2)_rOR^b$ ,  $-(CH_2)_rNR^cR^c$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-1  $R^f$  o haloalquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^b$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , o  $-(CH_2)_r$ -heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y  $S(O)_p$  sustituido con 0-1  $R^d$ ;

$R^c$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;

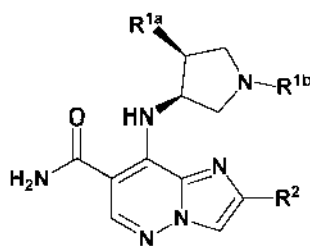
$R^d$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-OR^c$ , o alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^e$  es independientemente cada vez que aparece alquilo  $C_{1-6}$ ;

r es independientemente cada vez que aparece 0, 1, 2, 3 o 4; y

p es independientemente cada vez que aparece 0, 1 o 2.

En otra realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto tiene la fórmula III



Fórmula III.

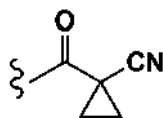
5 En otra realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que

$R^{1a}$  es independientemente cada vez que aparece H o alquilo  $C_{1-3}$  sustituido con 0-2  $R^a$ ;

$R^{1b}$  es  $-C(O)R^{1d}$ ;

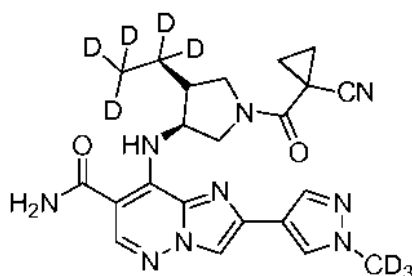
10  $R^{1d}$  es independientemente cada vez que aparece ciclopropilo, ciclobutilo u oxetano, cada grupo sustituido con 0-2  $R^d$ ; y

En otra realización de la presente invención, en la que  $R^{1a}$  es  $C_2D_5$  y  $R^{1b}$  es



15

En otra realización, se proporcionan compuestos de fórmula (II), o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el compuesto tiene la fórmula IV



20

Fórmula IV.

25 En otra realización son compuestos de Fórmula (II), en la que el compuesto de fórmula (II) se selecciona entre los Ejemplos del presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En otra realización la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y al menos uno de los compuestos de la presente invención, o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula II, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende: un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención, o un estereoisómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En otra realización, la presente invención proporciona al menos uno de los compuestos de la presente invención, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, combinado con al menos otro agente terapéutico, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias que comprende: administrar al paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación proporciona un método para tratar un paciente que necesita tratamiento para enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias, que comprende: administrar un compuesto de la presente invención, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una cantidad eficaz para tratar enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, en la que las enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias se seleccionan entre enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, asma, enfermedad de Graves, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, ojo  
10 seco, esclerosis múltiple, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante, rechazo al trasplante de órganos sólidos, rechazo al trasplante de células en islotes, y enfermedad de injerto frente a hospedador.

La presente divulgación proporciona un método novedoso, que comprende: administrar un compuesto de la presente invención o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable, del mismo en una cantidad eficaz para tratar  
15 enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias.

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (II) o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias, combinado con al menos otro agente antineoplásico o antiproliferativo y/u otro agente, o un  
20 estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias que comprende: administrar al paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los compuestos de la presente invención o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable, del mismo, combinado con al menos otro agente terapéutico, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.  
25

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en terapia.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en terapia para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria.

En otra realización, la presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula II de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria.  
35

La presente invención se puede llevar a cabo en otras formas específicas sin separarse del espíritu o atributos esenciales de la misma. Esta invención abarca todas las combinaciones de aspectos preferidos y/o realizaciones de la invención indicadas en el presente documento. Se entiende que cualquiera y todas las realizaciones de la presente invención pueden tomarse junto con cualquier otra realización o realizaciones para describir realizaciones adicionales. También ha de entenderse que cada elemento individual de las realizaciones es su propia realización independiente. Además, se entiende que cualquier elemento de una realización se combina con cualquiera y todos los demás elementos de cualquier realización para describir una realización adicional.  
40

#### 45 **Definiciones**

En la presente memoria descriptiva se pueden usar las siguientes definiciones de términos. La definición inicial proporcionada para un grupo o término del presente documento se aplica a dicho grupo o término en la totalidad de la presente memoria descriptiva de forma individual o como parte de otro grupo, a menos que se indique otra cosa.  
50

Los compuestos de esta invención pueden tener uno o más centros asimétricos. A menos que se indique otra cosa, todas las formas quirales (enantioméricas y diastereoméricas) y racémicas de los compuestos de la presente invención están incluidas en la presente invención. Muchas formas geométricas de olefinas, dobles enlaces C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos, y todos estos isómeros estables están contemplados en la presente invención. Se describen los isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención y pueden aislarse en forma de una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Los presentes compuestos pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. En la técnica, se sabe bien cómo preparar formas ópticamente activas, tales como por resolución de formas racémicas o por síntesis de materiales de partida ópticamente activos. Están contempladas todas las formas quirales (enantioméricas y diastereoméricas) y racémicas y todas las formas de isómeros geométricos de una estructura, salvo que se indique específicamente la estereoquímica o forma isomérica concretas.  
55  
60

El término "sustituido", tal como se usa en el presente documento, significa que uno o más de los átomos de hidrógeno del átomo designado están sustituidos por una selección del grupo indicado, con la condición de que la valencia normal del átomo designado no se supere, y que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. Cuando un sustituyente es ceto (es decir, =O), entonces se reemplazan 2 hidrógenos en el átomo. Los sustituyentes  
65

ceto no están presentes en restos aromáticos. Los dobles enlaces de anillo, tal como se usa en el presente documento, son dobles enlaces que se forman entre dos átomos de anillo adyacentes (por ejemplo, C=C, C=N o N=N).

- 5 Cuando cualquier variable (por ejemplo,  $R^3$ ) aparece más de una vez en cualquier constituyente o fórmula de un compuesto, su definición cada vez que aparece es independiente de su definición en cualquier otra aparición. Por lo tanto, por ejemplo, si se muestra que un grupo está sustituido con 0-2  $R^3$ , entonces dicho grupo puede estar opcionalmente sustituido hasta con dos grupos  $R^3$  y en cada caso  $R^3$  se selecciona independientemente entre la definición de  $R^3$ . Asimismo, solo se permiten las combinaciones de sustituyentes y/o variables en caso de que dichas combinaciones den como resultado compuestos estables.

- 15 Cuando se muestra un enlace a un sustituyente que cruza un enlace que conecta dos átomos en un anillo, entonces dicho sustituyente puede unirse a cualquier átomo del anillo. Cuando se relaciona un sustituyente sin indicar el átomo mediante el cual dicho sustituyente se une al resto del compuesto de una fórmula dada, entonces dicho sustituyente puede unirse a través de cualquier átomo en dicho sustituyente. Solo se permiten las combinaciones de sustituyentes y/o variables en caso de que dichas combinaciones den como resultado compuestos estables.

- 20 En los casos donde hay átomos de nitrógeno (por ejemplo, aminas) en los compuestos de la presente invención, estos se pueden convertir en N-óxidos por tratamiento con un agente oxidante (por ejemplo, MCPBA y/o peróxido de hidrógeno) para proporcionar otros compuestos de esta invención. Por lo tanto, se considera que todos los átomos de nitrógeno mostrados y reivindicados incluyen tanto el nitrógeno mostrado como su derivado de N-óxido (N→O).

- 25 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "alquilo" o "alquileo" incluya grupos hidrocarburo alifáticos saturados de cadena tanto ramificada como lineal que tengan el número de átomos de carbono especificado. Por ejemplo, "alquilo C<sub>1-10</sub>" (o alquileo), pretende incluir grupos alquilo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, y C<sub>10</sub>. Además, por ejemplo, "alquilo C<sub>1-C6</sub>" representa alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar no sustituidos o sustituidos de forma que uno o más de sus átomos de hidrógeno se han sustituido por otro grupo químico. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, aunque no de forma limitativa, metilo (Me), etilo (Et), propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, f-butilo), pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo), y se pretende que incluyan grupos deuterados, tales como CD<sub>3</sub> y CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, y similares.

- 35 "Alqueno" o "alquileo" pretende incluir cadenas de hidrocarburo en configuración tanto lineal como ramificada, y que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono que pueden aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena. Por ejemplo, "alqueno C<sub>2-6</sub>" (o alquileo), pretende incluir grupos alqueno C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, y C<sub>6</sub>. Los ejemplos de alqueno incluyen, aunque no de forma limitativa, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, 2-metil-2-propenilo, 4-metil-3-pentenilo, y similares.

- 40 "Alquino" o "alquileo" pretende incluir cadenas de hidrocarburo en configuración tanto lineal como ramificada, y que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono que pueden aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena. Por ejemplo, "alquino C<sub>2-6</sub>" (o alquileo), pretende incluir grupos alquino C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, y C<sub>6</sub>; tales como etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo y similares.

- 45 "Halo" o "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

- 50 El término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo ciclados, incluyendo sistemas de anillo mono, bi o policíclicos. Cicloalquilo C<sub>3-10</sub> pretende incluir grupos cicloalquilo C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, y C<sub>10</sub>. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, norbornilo, y similares. Tal como se usa en el presente documento, "carbociclo" o "resto carbocíclico" pretende indicar cualquier anillo bicíclico o tricíclico estable de 3, 4, 5, 6, o 7 miembros monocíclico o bicíclico o un anillo bicíclico o tricíclico de 7, 8, 9, o 10 miembros, cualquiera de los cuales puede estar saturado, parcialmente insaturado, insaturado o aromático. Los ejemplos de tales carbociclos incluyen, aunque no de forma limitativa, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclobutenilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, cicloheptenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, adamantilo, ciclooctilo, ciclooctenilo, ciclooctadienilo, [3.3.0]bicyclooctano, [4.3.0]bicyclononano, [4.4.0]bicyclodecano, [2.2.2]bicyclooctano, fluorenilo, fenilo, naftilo, indanilo, adamantilo, antraceno y tetrahidronaftilo (tetralina). Como se muestra anteriormente, los anillos con puente también están incluidos en la definición de carbociclo (por ejemplo, [2.2.2]bicyclooctano). Los carbociclos preferidos, salvo que se especifique otra cosa, son ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, fenilo e indanilo. Cuando se usa el término "carbociclo", pretende incluir "arilo". Un anillo con puentes se produce cuando uno o más átomos de carbono conectan dos átomos de carbono no adyacentes. Los puentes preferidos son uno a dos átomos de carbono. Nótese que un puente siempre convierte un anillo monocíclico en un anillo tricíclico. Cuando un anillo tiene puentes, los sustituyentes citados para el anillo también pueden estar presentes en el puente.

- 65 El término "arilo" se refiere a grupos hidrocarburo aromático monocíclicos o bicíclicos que tienen de 6 a 12 átomos de carbono en la parte del anillo, tales como grupos fenilo, naftilo, bifenilo y difenilo, cada uno de los cuales puede

estar sustituido.

El término "arilo sustituido" se refiere a un grupo arilo sustituido por, por ejemplo, de uno a cuatro sustituyentes tales como alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, halo, trifluorometoxi, trifluorometilo, hidroxilo, alcoxi, alcanóilo, alcanoloxi, ariloxi, arilalquilo, amino, alquilamino, arilamino, arilalquilamino, dialquilamino, alcanoilamino, tiol, alquiltio, ureido, nitro, ciano, carboxi, carboxialquilo, carbamilo, alcocarbonilo, alquiltiono, ariltiono, arilsulfonilamina, ácido sulfónico, alquilsulfonilo, sulfonamido, ariloxi y similares. El sustituyente puede estar adicionalmente sustituido por hidroxilo, halo, alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, arilo o arilalquilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático opcionalmente sustituido, por ejemplo, que es un sistema de anillo de 4 a 7 miembros monocíclico, de 7 a 11 miembros bicíclico, o de 10 a 15 miembros tricíclico, que tiene al menos un heteroátomo y al menos un anillo que contiene átomos de carbono, por ejemplo, piridina, tetrazol, indazol.

Tal como se usa en el presente documento, el término "heterociclo", "heterociclilo", "heterocíclico" o "anillo grupo" pretende significar un anillo heterocíclico estable de 5, 6 o 7 miembros monocíclico o bicíclico o de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 miembros bicíclico que está saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado, y que consiste en átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O y S; e incluyen cualquier grupo bicíclico en el que cualquiera de los anillos heterocíclicos- definiendo definidos se fusiona a un anillo de benceno. Los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados (es decir, N→O y S(O)<sub>p</sub>). El átomo de nitrógeno puede estar sustituido o no sustituido (es decir, N o NR, en la que R es H u otro sustituyente, en caso de estar definido). El anillo heterocíclico puede estar unido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Los anillos heterocíclicos descritos en el presente documento pueden estar sustituidos en un átomo de carbono o en uno de nitrógeno en caso de que el compuesto resultante sea estable. Un nitrógeno del heterociclo puede estar opcionalmente cuaternizado. Se prefiere que cuando el número total de átomos de S y O en el heterociclo exceda de 1, estos heteroátomos no se encuentren adyacentes entre sí. Se prefiere que el número total de átomos de S y O en el heterociclo no sea mayor de 1. Cuando se usa el término "heterociclo", se pretende incluir heteroarilo.

Los ejemplos de heterociclos incluyen, aunque no de forma limitativa, acridinilo, azocinilo, benzoimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, benzoisoxazolilo, benzoisotiazolilo, benzoimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2*H*,6*H*-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-*b*]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1*H*-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3*H*-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isotiazolopiridinilo, isoxazolilo, isoxazolopiridinilo, metilenedioxifenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2-pirrolidonilo, 2*H*-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4*H*-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6*H*-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo, triazinilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,5-triazolilo, 1,3,4-triazolilo y xantenilo. También se incluyen anillos condensados y compuestos espiro que contienen, por ejemplo, los heterociclos anteriores.

Los heterociclos de 5 a 10 miembros, aunque no de forma limitativa, piridinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, pirazinilo, piperazinilo, piperidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, indolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxazolilo, oxadiazolilo, oxazolidinilo, tetrahidrofuranilo, tiadiazinilo, tiadiazolilo, tiazolilo, triazinilo, triazolilo, benzoimidazolilo, 1*H*-indazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, benzoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, isatinoilo, isoquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, isoxazolopiridinilo, quinazolinilo, quinolinilo, isotiazolopiridinilo, tiazolopiridinilo, oxazolopiridinilo, imidazolopiridinilo y pirazolopiridinilo.

Los heterociclos de 5 a 6 miembros, aunque no de forma limitativa, piridinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, pirazinilo, piperazinilo, piperidinilo, imidazolilo, imidazolidinilo, indolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, oxazolilo, oxadiazolilo, oxazolidinilo, tetrahidrofuranilo, tiadiazinilo, tiadiazolilo, tiazolilo, triazinilo y triazolilo. También se incluyen anillos condensados y compuestos espiro que contienen, por ejemplo, los heterociclos anteriores.

En otra realización, los heterociclos incluyen, aunque no de forma limitativa, piridilo, piridinilo, isoxazilo, isoquinolinilo, tienilo, pirazolilo, furanilo, pirrolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazinilo, tiadiazolilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, indanonilo, piperazinilo, piranilo, o pirrolilo.

También se incluyen heterociclilos más pequeños, tales como, epóxidos, oxetanos y aziridinas.

El término heterociclo o heteroarilo incluye sustituyentes que tienen un anillo benzo o un anillo de cicloalquilo



condensado con otro anillo que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre N, O, o S, que incluyen, aunque no de forma limitativa, anillos que contienen  $-O-(CH_2)_n-O-$  unido a átomos adyacentes o a un átomo del mismo anillo.

5 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "grupo heterocíclico aromático" o "heteroarilo" signifique hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos estables que incluyen al menos un miembro de anillo de heteroátomo tal como azufre, oxígeno o nitrógeno. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furilo, quinolilo, isoquinolilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, indolilo, pirrolilo, oxazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, indazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, purinilo, carbazolilo, benzoimidazolilo, indolinilo, benzodioxolanilo, benzodioxano, y similares. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. El átomo de nitrógeno puede estar sustituido o no sustituido (es decir, N o NR, en la que R es H u otro sustituyente, en caso de estar definido). Los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados (es decir,  $N \rightarrow O$  y  $S(O)_p$ ). Debe indicarse que el número total de átomos de S y O en el heterociclo aromático no es mayor de 1. Los anillos con puentes también se incluyen en la definición de heterociclo. Un anillo con puentes se da cuando uno o más átomos (es decir, C, O, N, o S) enlazan dos átomos de carbono o nitrógeno no adyacentes. Los puentes preferidos incluyen, aunque no de forma limitativa, un átomo de carbono, dos átomos de carbono, un átomo de nitrógeno, dos átomos de nitrógeno y un grupo de carbono-nitrógeno. Nótese que un puente siempre convierte un anillo monocíclico en un anillo tricíclico. Cuando un anillo tiene puentes, los sustituyentes citados para el anillo también pueden estar presentes en el puente.

20 El término "anillo carbocíclico" o "carbociclo" se refiere a anillos de hidrocarburo monocíclicos o bicíclicos estables, saturados, parcialmente saturados o insaturados que contienen 3-12 átomos. En particular, esto incluye un anillo monocíclico que contiene 5 o 6 átomos o un anillo bicíclico que contiene 9 o 10 átomos. Los valores adecuados incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, dihidroindenilo y tetrahidronaftilo. El término "opcionalmente sustituido" como se hace referencia a un "anillo carbocíclico" o "carbociclilo" en el presente documento indica que el anillo carbocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones sustituibles del anillo por uno o más grupos seleccionados independientemente entre alquilo (preferiblemente alquilo inferior), alcoxi (preferiblemente alcoxi inferior), nitro, monoalquilamino (preferiblemente un alquilamino inferior), dialquilamino (preferiblemente un dialquil[inferior]amino), ciano, halo, haloalquilo (preferiblemente trifluorometilo), alcanóilo, aminocarbonilo, monoalquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquilamido (preferiblemente alquilamido inferior), alcoxialquilo (preferiblemente un alcoxi [inferior] alquilo), alcoxicarbonilo (preferiblemente un alcoxicarbonilo inferior), alquil carbonilo (preferiblemente un alquilcarbonilo inferior) y arilo (preferiblemente fenilo), estando dicho arilo opcionalmente sustituido con halo, alquilo inferior y grupos alquilo inferiores.

35 El término "heteroátomos" debe incluir oxígeno, azufre y nitrógeno.

Los compuestos de fórmula I pueden existir en forma libre (sin ionización) o puede formar sales que están comprendidas dentro del alcance de esta invención. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque otras sales pueden ser también útiles, *por ejemplo*, para aislar o purificar los compuestos de esta invención.

45 Los compuestos de fórmula I pueden formar sales con metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio, con metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio, con bases orgánicas tales como diciclohexilamina, tributilamina, piridina y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. Dichas sales se pueden formar tal como conocen los expertos en la materia.

50 Los compuestos de fórmula I también pueden formar sales con varios ácidos orgánicos e inorgánicos. Dichas sales incluyen las formadas con cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico y otros adicionales (por ejemplo, nitratos, fosfatos, boratos, tartratos, citratos, succinatos, benzoatos, ascorbato, salicilato y similares). Dichas sales se pueden formar tal como conocen los expertos en la materia.

Además, se pueden formar iones híbridos ("sales internas").

55 Se contemplan todos los estereoisómeros de los compuestos de la presente invención, tanto en premezcla como en forma pura o sustancialmente pura. La definición de compuestos de acuerdo con la invención abarca todos los posibles estereoisómeros y sus mezclas. Abarca muy especialmente las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados que tienen actividad específica. Las formas racémicas se pueden resolver por métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos mediante cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener a partir de los racematos por los métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de la sal con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

65 Se pretende que la presente invención incluya todos los isótopos de los átomos que se encuentran en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero números másicos diferentes. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen deuterio y tritio. Los

isótopos de carbono incluyen  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ . Los compuestos de la invención marcados isotópicamente pueden prepararse generalmente por técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia o mediante procesos análogos a los descritos en el presente documento, usando un reactivo adecuado marcado isotópicamente en lugar del reactivo no marcado que de otro modo se emplea. Se pretende que la presente invención cubra todos los isótopos en su abundancia natural, así como los isótopos enriquecidos artificialmente, tales como el grupo  $\text{CD}_3$  y  $\text{CD}_2\text{CD}_3$ , (metilo deuterado y etilo deuterado).

Los compuestos de la fórmula I también pueden tener formas de profármaco. Como se sabe que los profármacos potencian numerosas calidades deseables de los compuestos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma de profármaco. Por lo tanto, la presente invención pretende abarcar los profármacos de los compuestos actualmente reivindicados, métodos para administrar los mismos y composiciones que contienen los mismos. Se pretende que "profármacos" incluyan cualesquiera transportadores unidos covalentemente que liberen un fármaco precursor activo de la presente invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de la presente invención se preparan modificando grupos funcionales presentes en el compuesto de la invención de tal forma que se escindan las modificaciones, ya sea mediante manipulación rutinaria o en vivo, en el compuesto precursor. Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención en los que un grupo hidroxilo, amino, o sulfhidrilo se une a cualquier grupo que, cuando el profármaco de la presente invención se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, o sulfhidrilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, aunque no de forma limitativa, derivados de acetato, formiato, y benzoato de alcohol y de grupos funcionales de amina en los compuestos de la presente invención.

Se conocen bien en la técnica diversas formas de profármaco. Para ejemplos de dichos derivados de profármacos, véanse:

- a) Bundgaard, H., ed., Design of Prodrugs, Elsevier (1985) y Widder, K. et al., eds., Methods in Enzymology, 112:309-396, Academic Press (1985);
- b) Bundgaard, H., Capítulo 5, "Design and Application of Prodrugs", Krosgaard-Larsen, P. et al., eds., A Textbook of Drug Design and Development, pp. 113-191, Harwood Academic Publishers (1991); y
- c) Bundgaard, H., Adv. Drug Deliv. Rev., 8:1-38 (1992).

Se deberá entender además que los solvatos (por ejemplo, hidratos) de los compuestos de fórmula I también están incluidos en el alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica.

Por "compuesto estable" y "estructura estable" se entiende un compuesto que es suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción y a su formulación en un agente terapéutico eficaz. Se prefiere que los compuestos actualmente citados no contengan un grupo N-halo,  $\text{S(O)}_2\text{H}$  o  $\text{S(O)H}$ . La presente invención se refiere a compuestos estables. Se pretende que los compuestos de la invención incluyan compuestos que son compuestos estables.

Tal como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluyen: (a) prevenir la aparición de la patología en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene predisposición a la patología pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, es decir, detener su desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, es decir, provocar la regresión de la patología.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz cuando se administra solo o en combinación. También se pretende que "cantidad terapéuticamente eficaz" incluya una cantidad de la combinación de compuestos que es eficaz para el tratamiento de la enfermedad.

La presente invención incluye además composiciones que comprenden uno o más compuestos de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a medios generalmente aceptados en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a animales, en particular, mamíferos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se formulan de acuerdo con un número de factores bien dentro del alcance de los expertos en la materia. Estos incluyen, sin limitación: el tipo y la naturaleza del principio activo que se vaya a formular; el sujeto al cual se vaya a administrar la composición que contiene el principio; la vía de administración prevista de la composición; y la indicación terapéutica considerada como objetivo. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen medios líquidos tanto acuosos como no acuosos, así como diversas formas farmacéuticas sólidas y semisólidas. Dichos transportadores pueden incluir una serie de ingredientes y aditivos diferentes además del principio activo, incluyéndose dichos ingredientes adicionales en la formulación por diversos motivos, *por ejemplo*, estabilización del principio activo, aglutinantes, etc., bien conocidos por los expertos en la materia. Las descripciones de transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados y de los factores implicados en su selección, se encuentran en diversas fuentes fácilmente disponibles tales como, por ejemplo,

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

#### UTILIDAD

5 Los compuestos de la invención modulan la actividad quinasa, incluyendo la modulación de JAK3. Otros tipos de actividad quinasa que se puede modular mediante los compuestos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, otros miembros de la familia de enzimas JAK, tal como JAK1.

10 Por consiguiente, los compuestos de fórmula (II) tienen utilidad en el tratamiento de dolencias asociadas con la modulación de la actividad quinasa y, especialmente, la invención, selectiva de la actividad de JAK3 o la inhibición de otras quinasas de la familia JAK tal como JAK1. Dichas dolencias incluyen enfermedades mediadas por linfocitos T, en las que los niveles de citoquina se modulan como consecuencia de la señalización intracelular. En otra realización, los compuestos de fórmula (II) tienen una selectividad funcional ventajosa para la actividad de JAK3 en comparación con otras quinasas de la familia JAK tales como JAK2, preferiblemente desde al menos 10 veces a más de 100 veces más selectivo.

20 Tal como se usa en el presente documento, Los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan el tratamiento de una patología en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluyen: (a) prevenir o retrasar la aparición de la patología en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene predisposición a la patología pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, es decir, detener su desarrollo; y/o (c) conseguir una reducción completa o parcial de los síntomas de la patología, y/o aliviar, mejorar, disminuir o curar la enfermedad o trastorno y/o sus síntomas.

25 A la vista de su actividad como inhibidores selectivos de JAK3 y otras quinasas de la familia JAK tales como JAK1, los compuestos de Fórmula (II) son útiles en el tratamiento de dolencias asociadas a citoquinas que incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, asma, enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedad de Graves, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, ojo seco, esclerosis múltiple, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante, además de dolencias tales como rechazo de trasplantes de órganos sólidos, rechazo al trasplante de células en islotes, y enfermedad de injerto frente a hospedador.

35 A la vista de su actividad como inhibidores de JAK3, los compuestos de Fórmula (II) son útiles para el tratamiento de neoplasias malignas donde JAK3 ha experimentado una mutación o una expresión en exceso, o donde JAK3 tiene un importante papel en el crecimiento o la supervivencia de las células malignas. Dichas neoplasias malignas incluyen leucemia megacarioblástica aguda (AMKL), linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL), linfoma anaplásico, linfoma anaplásico de células grandes que expresan la quinasa (ALK) (ALK(+)/ALCL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) con mutaciones en JAK3, y linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL).

40 Más particularmente, las dolencias o enfermedades específicas que se pueden tratar con los compuestos de la invención incluyen, sin limitación, asma, alergias, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, tiroiditis crónica, enfermedad de Graves, gastritis autoinmunitaria, diabetes, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, trombocitopenia, dermatitis atópica, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de linfocitos  $\beta$  pancreáticos; espondilitis reumatoide, rechazo de aloinjerto, colitis ulcerosa, ojo seco y pénfigo vulgar. Los métodos de tratamiento preferidos son aquellos en los que la dolencia se selecciona entre rechazo de aloinjerto, artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, lupus y ojo seco.

50 Cuando se usan en el presente documento expresiones como "dolencia asociada a JAK3" o "enfermedad o trastorno asociado a JAK3", cada uno pretende abarcar todas las dolencias anteriormente identificadas como si se repitiera en toda su longitud, así como cualquier otra dolencia que se vea afectada por la actividad quinasa de JAK3.

55 La presente invención proporciona así al menos un compuesto de Fórmula (II) o una sal del mismo para su uso en terapia para el tratamiento de dichas dolencias. "Cantidad terapéuticamente eficaz" pretende incluir una cantidad de un compuesto de la presente invención que es eficaz cuando se administra sola o en combinación, para inhibir JAK3 y otras quinasas de la familia JAK y/o para tratar enfermedades.

60 Los métodos para tratar dolencias asociadas a la quinasa JAK3 pueden comprender administrar compuestos de Fórmula (II) solos o junto con cada uno de otros y/u otros agentes terapéuticos útiles para tratar dichas dolencias. Por consiguiente, también se pretende que "cantidad terapéuticamente eficaz" incluya una cantidad de la combinación de compuestos reivindicados que es eficaz para inhibir JAK3 y/o para tratar enfermedades asociadas con JAK3.

65 Los ejemplos de dichos otros agentes terapéuticos incluyen abatacept, belatacept, corticoesteroides, rolipram, calfofostina, fármacos antiinflamatorios supresores de citoquinas (CSAID), Interleuquina-10, glucocorticoides,

salicilatos, óxido nítrico, y otros inmunosupresores; inhibidores de la translocación nuclear, tales como desoxipergualina (DSG); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como ibuprofeno, celecoxib y rofecoxib; inhibidores de p38 tales como BMS-582949, esteroides tales como prednisona o dexametasona; agentes antivíricos tales como abacavir; agentes antiproliferativos tales como metotrexato, leflunomida, FK506 (tacrolimus, PROGRAF®); fármacos citotóxicos tales como azatiprina y ciclofosfamida; inhibidores de TNF- $\alpha$  tales como tenidap, anticuerpos dirigidos contra TNF o el receptor de TNF soluble, y rapamicina (sirolimus o RAPAMUNE®) o derivados de los mismos.

Los anteriores agentes terapéuticos diferentes, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en las cantidades indicadas en el *Physicians' Desk Reference* (PDR) o como se determina de otro modo por un experto en la técnica. En los métodos de la presente invención, dichos uno o más agentes terapéuticos diferentes pueden administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de los compuestos de la invención. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas capaces de tratar dolencias asociadas con la quinasa JAK3, incluyendo dolencias mediadas por IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, y IFN $\gamma$ , como se ha descrito anteriormente.

Las composiciones de la invención pueden contener otros agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente y se pueden formular, por ejemplo, empleando vehículos o diluyentes sólidos o líquidos convencionales, así como aditivos farmacéuticos de un tipo adecuado al modo de administración deseado (por ejemplo, excipientes, aglutinantes, conservantes, estabilizadores, aromas, etc.) de acuerdo con técnicas tales como aquellas bien conocidas en el campo de la formulación farmacéutica.

Por consiguiente, la presente invención incluye además composiciones que comprenden uno o más compuestos de Fórmula (II) y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a medios generalmente aceptados en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a animales, en particular, mamíferos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se formulan de acuerdo con un número de factores bien dentro del alcance de los expertos en la materia. Estos incluyen sin limitación el tipo y la naturaleza del principio activo a formular; el sujeto al cual se vaya a administrar la composición que contiene el principio; la vía de administración prevista de la composición; y, la indicación terapéutica considerada como objetivo. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen medios líquidos tanto acuosos como no acuosos, así como diversas formas farmacéuticas sólidas y semisólidas. Dichos transportadores pueden incluir una serie de ingredientes y aditivos diferentes además del principio activo, incluyéndose dichos ingredientes adicionales en la formulación por diversos motivos, *por ejemplo*, estabilización del principio activo, aglutinantes, etc., bien conocidos por los expertos en la materia. Las descripciones de transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados y de los factores implicados en su selección, se encuentran en diversas fuentes fácilmente disponibles tales como, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> Edición (1985), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los compuestos de Fórmula (II) se pueden administrar por cualquier medio adecuado para la dolencia a tratar, que puede depender de la necesidad de tratamiento específico de sitio o la cantidad de fármaco a administrar. La administración tópica se prefiere en general para enfermedades relacionadas con la piel, y el tratamiento sistémico se prefiere para dolencias cancerosas o precancerosas, aunque se contemplan otras vías de administración. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, o formulaciones líquidas que incluyen jarabes; por vía tópica, tal como en forma de soluciones, suspensiones, geles o pomadas; por vía sublingual; por vía bucal; por vía parenteral, tal como mediante técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal (por ejemplo, tales como soluciones o suspensiones estériles inyectables acuosas o no acuosas); por vía nasal tal como mediante pulverizador de inhalación; por vía tópica, tal como en forma de una crema o pomada; por vía rectal tal como en forma de supositorios; o por vía liposómica. Se pueden administrar formulaciones farmacéuticas unitarias que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación extendida. La liberación inmediata o la liberación prolongada se pueden conseguir con composiciones farmacéuticas adecuadas o, particularmente en el caso de la liberación extendida, con dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Las composiciones ilustrativas para administración tópica incluyen un transportador tópico tal como PLASTIBASE® (aceite mineral gelificado con polietileno).

Las composiciones ilustrativas para administración oral incluyen suspensiones que pueden contener, por ejemplo, celulosa microcristalina para transmitir volumen, ácido alginico o alginato de sodio como agente de suspensión, metilcelulosa como mejorador de la viscosidad, y edulcorantes o aromatizantes tal como es conocido en la técnica; y comprimidos de liberación inmediata que pueden incluir, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, almidón, estearato de magnesio y/o lactosa y/u otros excipientes, aglutinantes, extensores, disgregantes, diluyentes y lubricantes tales como los conocidas en la técnica. Los compuestos de la invención también pueden administrarse mediante administración sublingual y/o bucal, *por ejemplo*, con comprimidos moldeados, fabricados por compresión,

o liofilizados. Las composiciones ilustrativas pueden incluir diluyentes de disolución rápida tales como manitol, lactosa, sacarosa, y/o ciclodextrinas. En dichas formulaciones también se pueden incluir excipientes de elevado peso molecular tales como celulosas (AVICEL®) o polietilenglicoles (PEG); un excipiente para ayudar a la adhesión a mucosas tales como hidroxipropil celulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa de sodio (SCMC), y/o copolímero de anhídrido maleico (por ejemplo, GANTREZ®); y agentes para controlar la liberación tales como copolímero poliacrílico (por ejemplo, CARBOPOL 934®). Lubricantes, emolientes, aromas, agentes colorantes y estabilizadores también se pueden añadir para facilitar la fabricación y el uso.

Las composiciones ilustrativas para administración mediante aerosol o inhalación nasal incluyen soluciones que pueden contener, por ejemplo, alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la absorción y/o la biodisponibilidad, y/u otros agentes de solubilización o dispersión tales como los conocidos en la técnica.

Las composiciones ilustrativas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o disolvente parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, una solución isotónica de cloruro sódico, u otros agentes dispersantes o humectantes, y agentes de suspensión, incluidos monoglicéridos o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos, incluido ácido oleico.

Las composiciones ilustrativas para administración rectal incluyen supositorios que pueden contener, por ejemplo, excipientes no irritantes adecuados, tal como manteca de cacao, ésteres de glicérido sintético o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero que se licuan y/o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Un experto en la materia puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, e incluye cantidades de dosificación ilustrativas para un mamífero de aproximadamente 0,05 a 1000 mg/kg; 1-1000 mg/kg; 1-50 mg/kg; 5-250 mg/kg; 250-1000 mg/kg de peso corporal de principio activo al día, que se pueden administrar en una sola dosis, o en forma de dosis individuales divididas, tales como de 1 a 4 veces por día. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosis para cualquier sujeto concreto se puede variar y dependerán de diversos factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la especie, edad, peso corporal, estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto, el modo y la frecuencia de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la dolencia particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, con máxima preferencia especie de mamífero tales como seres humanos y animales domésticos tales como perros, gatos, caballos, y similares. Por lo tanto, cuando el término "paciente" se usa en el presente documento, este término pretende incluir todos los sujetos, con máxima preferencia especies de mamífero, que están afectados por la mediación de los niveles de enzima JAK3.

## DOSIS Y FORMULACIÓN

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, cápsulas (cada una de las que incluye formulaciones de liberación sostenida o de liberación programada), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones. También pueden administrarse en forma intravenosa (bolo o infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, usando todas formas de dosificación bien conocidas por aquellos expertos en la materia farmacéutica. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán con un transportador seleccionado dependiendo de la ruta de administración escogida y a la práctica farmacéutica normalizada.

El régimen de dosificación para los compuestos de la presente invención, por supuesto, variará dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración; la especie, edad, el sexo, salud, el estado médico y el peso del destinatario; la naturaleza y el alcance de los síntomas; la clase de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; la vía de administración, la función renal y hepática del paciente y el efecto deseado. Un médico o un veterinario pueden determinar y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerido para tratar el cáncer.

A modo de guía general, la dosificación oral diaria de cada principio activo, cuando se usa para los efectos indicados, estará comprendida de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal al día, y con máxima preferencia de aproximadamente 0,001 a 20 mg/kg/día. Por vía intravenosa, las dosis más preferidas estarán comprendidas de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en una única dosis diaria o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosis para cualquier sujeto concreto se puede variar y dependerán de diversos factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la especie, edad, peso corporal, estado de salud general, el sexo y la alimentación del sujeto, el modo y la frecuencia de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la dolencia particular.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse de forma intranasal a través del uso tópico de vehículos intranasales adecuados o a través de vías transdérmicas, usando parches cutáneos transdérmicos. Cuando se administra en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosis será, por supuesto, continua en lugar de intermitente para todo el régimen de dosificación.

Los compuestos se administran normalmente en una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (denominados colectivamente en el presente documento vehículos farmacéuticos) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración prevista, es decir, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes, y similares, y de forma consistente con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Los compuestos de Fórmula (II) se pueden administrar por cualquier medio adecuado para la dolencia a tratar, que puede depender de la necesidad de tratamiento específico de sitio o la cantidad de fármaco a administrar. La administración tópica se prefiere en general para enfermedades relacionadas con la piel, y el tratamiento sistémico se prefiere para dolencias cancerosas o precancerosas, aunque se contemplan otras vías de administración. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse por vía oral, tal como en forma de comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, o formulaciones líquidas que incluyen jarabes; por vía tópica, tal como en forma de soluciones, suspensiones, geles o pomadas; por vía sublingual; por vía bucal; por vía parenteral, tal como mediante técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal (por ejemplo, tales como soluciones o suspensiones estériles inyectables acuosas o no acuosas); por vía nasal tal como mediante pulverizador de inhalación; por vía tópica, tal como en forma de una crema o pomada; por vía rectal tal como en forma de supositorios; o por vía liposómica. Se pueden administrar formulaciones farmacéuticas unitarias que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse en una forma adecuada para la liberación inmediata o la liberación extendida. La liberación inmediata o la liberación prolongada se pueden conseguir con composiciones farmacéuticas adecuadas o, particularmente en el caso de la liberación extendida, con dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente farmacológico activo puede combinarse con un transportador inerte no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para la administración oral en forma líquida, los componentes del fármaco oral pueden combinarse con cualquier vehículo oral inerte, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de transporte de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención pueden acoplarse también a polímeros adecuados como vehículos farmacéuticos que pueden marcarse como diana. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamidafenol u óxido de polietileno-polilisina sustituido con restos palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

Las formas farmacéuticas (composiciones farmacéuticas) adecuadas para la administración pueden contener de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 1000 miligramos de ingrediente activo por unidad de dosificación. En estas composiciones farmacéuticas el principio activo estará habitualmente presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1-95 % en peso basado en el peso total de la composición.

Las cápsulas de gelatina pueden contener el principio activo y transportadores en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Para elaborar comprimidos compactados pueden usarse diluyentes similares. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden fabricarse como productos de liberación sostenida para proporcionar la liberación continua de la medicación durante un periodo de horas. Los comprimidos pueden estar recubiertos de azúcar o recubiertos de una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger al comprimido de la atmósfera, o pueden recubiertos de forma gastrorresistente para la desintegración selectiva en el tracto intestinal.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

5 En general, agua, un aceite adecuado, solución salina, solución acuosa de dextrosa (glucosa), y soluciones de azúcares relacionados y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son vehículos adecuados para soluciones parenterales. Las soluciones para administración parenteral contienen preferentemente una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizantes adecuados y, si es necesario, sustancias tamponantes. Los agentes antioxidantes tales como bisulfito sódico, sulfito de sodio o el ácido ascórbico, bien solos o combinados, son  
10 agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales y EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propilpabareno y clorobutanol.

15 Los vehículos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia estándar en este campo.

Los sujetos para el tratamiento incluyen animales, con máxima preferencia especie de mamífero tales como seres humanos y animales domésticos tales como perros, gatos, caballos, y similares. Por lo tanto, cuando el término "paciente" se usa en el presente documento, este término pretende incluir todos los sujetos, con máxima preferencia especies de mamífero, que están afectados por la mediación de los niveles de enzima JAK3.

## ENSAYOS BIOLÓGICOS

### Protocolo de ensayo de la quinasa JAK3 (Caliper)

25 Se llevaron a cabo las reacciones de ensayo en placas de 384 pocillos de fondo en U. El volumen final del ensayo era de 30  $\mu$ l preparado a partir de adiciones 15  $\mu$ l de enzimas y sustratos (péptido fluoresceinado y ATP) y compuestos de ensayo en el tampón de ensayo (HEPES 100 mM pH 7,4,  $MgCl_2$  10 mM, beta-glicerol fosfato 25 mM, Brij35 al 0,015 % y DTT 4 mM). Se inició la reacción mediante la combinación de la enzima GST-JAK3 con sustratos  
30 y compuestos de ensayo. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 3 horas y se terminaron añadiendo 60  $\mu$ l de EDTA 35 mM a cada muestra. Cada mezcla de reacción se analizó en el calibre LABCHIP® 3000 (Caliper, Hopkinton, MA) mediante separación electroforética del sustrato fluorescente y del producto fosforilado. Se calcularon los datos de la inhibición mediante comparación con las reacciones del control sin enzimas para una inhibición del 100 %, y las reacciones tratadas solo con vehículo para una inhibición del 0 %. La concentración final de los reactivos en el ensayo era: ATP, 8  $\mu$ M; péptido fluoresceinado, 1,5  $\mu$ M; GST-JAK3, 4,5 nM; y DMSO, 1,6 %. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar la concentración requerida que inhibe el 50 % de actividad de la quinasa ( $CI_{50}$ ). Los compuestos se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron a once concentraciones. Los valores de la  $CI_{50}$  se derivaron mediante el análisis de la regresión no lineal.

40

### Protocolo de ensayo de la quinasa JAK3 (Filtro)

Las reacciones de la quinasa consistieron en 5 ng de enzima JAK3, sustrato CSKtide 30  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ Ci  $^{33}P$   $\gamma$ -ATP, ATP 8  $\mu$ M en 30  $\mu$ l de tampón quinasa (Hepes 50 mM, pH 8,0,  $MgCl_2$  10 mM, EGTA 1 mM, DTT 2 mM). Se incubaron las  
45 reacciones durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvieron mediante la adición de ácido tricloroacético frío (TCA) a una concentración final del 15 %. Se recogieron los precipitados de TCA sobre filtros de fosfocelulosa de 384 pocillos (Millipore) usando una PLATEMATE® para transferir la mezcla de reacción, se lavaron en un lavador de placas EMBLA y se cuantificaron los filtros usando un contador de centelleo líquido de 384 pocillos TOPCOUNT®. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar la concentración requerida que inhibe el 50 % de actividad de la quinasa ( $CI_{50}$ ). Los compuestos se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron a seis concentraciones, cada una por triplicado. La concentración final de DMSO en el ensayo se igualó al 2 %. Los valores de la  $CI_{50}$  se derivaron mediante el análisis de la regresión no lineal.

50

### Protocolo de ensayo de la quinasa JAK2

55

Se llevaron a cabo las reacciones de ensayo en placas de 384 pocillos de fondo en U. El volumen final del ensayo era de 30  $\mu$ l preparado a partir de adiciones 15  $\mu$ l de enzimas y sustratos (péptido fluoresceinado y ATP) y compuestos de ensayo en el tampón de ensayo (HEPES 100 mM pH 7,4,  $MgCl_2$  10 mM, beta-glicerol fosfato 25 mM, Brij35 al 0,015 % y DTT 4 mM). Se inició la reacción mediante la combinación de la enzima GST-JAK2 con sustratos  
60 y compuestos de ensayo. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 3 horas y se terminaron añadiendo 60  $\mu$ l de EDTA 35 mM a cada muestra. Cada mezcla de reacción se analizó en el calibre LABCHIP® 3000 (Caliper, Hopkinton, MA) mediante separación electroforética del sustrato fluorescente y del producto fosforilado. Se calcularon los datos de la inhibición mediante comparación con las reacciones del control sin enzimas para una inhibición del 100 %, y las reacciones tratadas solo con vehículo para una inhibición del 0 %. La concentración final de los reactivos en el ensayo era: ATP, 30  $\mu$ M; péptido fluoresceinado, 1,5  $\mu$ M; GST-JAK2, 1,5 nM; y DMSO, 1,6 %. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar la concentración requerida que  
65

inhibe el 50 % de actividad de la quinasa (Cl<sub>50</sub>). Los compuestos se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron a once concentraciones. Los valores de la Cl<sub>50</sub> se derivaron mediante el análisis de la regresión no lineal.

#### 5 Protocolo de ensayo de la quinasa JAK1

Se llevaron a cabo las reacciones de ensayo en placas de 384 pocillos de fondo en U. El volumen final del ensayo era de 30 µl preparado a partir de adiciones 15 µl de enzimas y sustratos (péptido fluoresceinado y ATP) y compuestos de ensayo en el tampón de ensayo (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub>10 mM, beta-glicerol fosfato 25 mM, Brij35 al 0,015 % y DTT 4 mM). Se inició la reacción mediante la combinación de la enzima GST-JAK1 con sustratos y compuestos de ensayo. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 3 horas y se terminaron añadiendo 60 µl de EDTA 35 mM a cada muestra. Cada mezcla de reacción se analizó en el calibre LABCHIP® 3000 (Caliper, Hopkinton, MA) mediante separación electroforética del sustrato fluorescente y del producto fosforilado. Se calcularon los datos de la inhibición mediante comparación con las reacciones del control sin enzimas para una inhibición del 100 %, y las reacciones tratadas solo con vehículo para una inhibición del 0 %. La concentración final de reactivos en los ensayos era: ATP, 100 µM; péptido fluoresceinado, 1,5 µM; GST-JAK1, 12,5 nM; y DMSO, 1,6 %. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar la concentración requerida que inhibe el 50 % de actividad de la quinasa (Cl<sub>50</sub>). Los compuestos se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron a once concentraciones. se derivaron los valores de la Cl<sub>50</sub> mediante un análisis de regresión no lineal.

#### Protocolo de ensayo de la quinasa TYK2

Se llevaron a cabo las reacciones de ensayo en placas de 384 pocillos de fondo en U. El volumen final del ensayo era de 30 µl preparado a partir de adiciones 15 µl de enzimas y sustratos (péptido fluoresceinado y ATP) y compuestos de ensayo en el tampón de ensayo (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub>10 mM, beta-glicerol fosfato 25 mM, Brij35 al 0,015 % y DTT 4 mM). Se inició la reacción mediante la combinación de la enzima HIS-TYK2 con sustratos y compuestos de ensayo. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 3 horas y se terminaron añadiendo 60 µl de EDTA 35 mM a cada muestra. Cada mezcla de reacción se analizó en el calibre LABCHIP® 3000 (Caliper, Hopkinton, MA) mediante separación electroforética del sustrato fluorescente y del producto fosforilado. Se calcularon los datos de la inhibición mediante comparación con las reacciones del control sin enzimas para una inhibición del 100 %, y las reacciones tratadas solo con vehículo para una inhibición del 0 %. La concentración final de los reactivos en el ensayo era: ATP, 70 µM; péptido fluoresceinado, 1,5 µM; HIS-TYK2, 2,25 nM; y DMSO, 1,6 %. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para determinar la concentración requerida que inhibe el 50 % de actividad de la quinasa (Cl<sub>50</sub>). Los compuestos se disolvieron a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se evaluaron a once concentraciones. Los valores de la Cl<sub>50</sub> se derivaron mediante el análisis de la regresión no lineal.

#### Protocolo de ensayo de proliferación de linfocitos T dependiente de IL-2

se prepararon blastos PHA expandidos en IL-2 (linfocitos T activados) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se prepararon a partir de sangre completa humana. 15 ml de sangre se mezclaron con 15 ml de RPMI (Gibco n.º 61870) en un tubo de centrifuga de 50 ml y se distribuyeron en capas con 12 ml de medio de separación de linfocitos (LSM) (MC Biomedicals n.º 1492254). Se centrifugaron los tubos a 1800 rpm durante 25 minutos y se dejó que se detuvieran sin frenar. Los aglomerados de glóbulos rojos y las PBMC se atraparon en la interfase entre las capas de LSM y de suero RPMI. la mezcla de suero/RPMI se pipeteó desde arriba de la capa de PBMC y se descartó. Las PBMC de los 2 tubos se recogieron en una pipeta junto con algo de la capa LSM y se combinaron en un único tubo. Cada tubo se llevó a 50 ml y se centrifugó a 1400 rpm durante 10 minutos. Los aglomerados celulares se volvieron a suspender en RPMI, se combinaron en 1 tubo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Las células se volvieron a suspender en un medio de cultivo celular (RPMI con suero de feto de bovino al 10 % (Summit Biotechnology n.º RS-50-05), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco n.º 14140-122)) con 5 µg/ml de PHA (Sigma n.º L1668) a 2X10<sup>6</sup> células/ml y se incubaron durante 3 días a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron 3X y se volvieron a suspender a 5X10<sup>5</sup> células/ml y se añadieron 25 unidades/ml de IL-2 (BD Bioscience n.º 356043). Después de 4 días de incubación a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %, las células se lavaron 3X y se volvieron a suspender a 2X10<sup>6</sup> células/ml y reposaron 2 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % antes del uso.

Los compuestos se diluyeron en DMSO (por triplicado) a una concentración final elevada de 800X en el ensayo y se llevaron a cabo diluciones en serie 3 veces para dar seis concentraciones. Cada concentración se diluyó 1:20 en medio para dar la concentración intermedia. DMSO se diluyó 1:20 en medio para usar en pocillos con compuestos.

45 µl de medio más 5 µl de la dilución intermedia del compuesto o DMSO se añadieron a cada pocillo de ensayo en la placa de ensayo. 100 µl de células a 3X10<sup>5</sup> células/ml se añadieron a cada pocillo. Se incubaron las placas 60 minutos a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % y se añadieron 50 µl de IL-2 a 200 unidades/ml a cada pocillo. Los pocillos del control negativo recibieron 100 µl de medio. Las placas se incubaron 3 días a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. 0,5 µC<sup>3</sup> de H-Timidina en 20 µl de medio se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron 6 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Se



recogieron las placas sobre una placa de filtro UNIFILTER®-96 GF/C (Perkin Elmer 6005174) usando un Packard Filtermate Harvester. La parte inferior de cada placa de filtro seca se cerró herméticamente, se añadieron 50 µl de Microscint 20 (Perkin Elmer n.º 6013621) a cada pocillo y la parte superior de la placa se cerró herméticamente. Se determinó la proliferación como se midió mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina por recuento en un Packard TOPCOUNT®-NXT.

IL-2 indujo la fosforilación de STAT3 en el ensayo de blastos PHA

Se prepararon blastos PHA expandidos en IL-2 (véase el Protocolo de ensayo de proliferación de linfocitos T dependiente de IL-2 para la preparación de blastos PHA expandidos en IL-2). Los compuestos se diluyeron en DMSO (por duplicado) a una concentración elevada final de 333,3X en el ensayo y se llevaron a cabo diluciones en serie 3 veces para dar seis concentraciones. Cada concentración se diluyó 1:20 en medio para dar la concentración intermedia. DMSO se diluyó 1:20 en medio RPMI (Gibco n.º 61870) para usar en pocillos sin compuesto.

173 µl/pocillo de una suspensión de blastocitos PHA a  $5,78 \times 10^6$  células/ ml se añadieron a una placa de cultivo de tejido de fondo redondeado (FALCON® n.º 353077) seguido de 12 µl de la dilución del compuesto intermedio o DMSO para los pocillos sin compuesto. La placa se incubó a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 30 minutos. se añadieron 15 µl de 266,7 ng/ ml de IL-2 (R&D n.º 202-IL-050) en medio a cada pocillo o medio solo a los pocillos del control negativo. Las placas se mezclaron en un agitador orbital durante 1 minuto y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante un total de 10 minutos. Se centrifugaron las placas 4 minutos a 1500 rpm y 150 µl del cultivo sobrenadante se retiraron de cada pocillo dejando el aglomerado intacto. Las placas se mezclaron en un agitador orbital durante 1 minuto y se añadieron 50 µl de tampón de lisis 2X (Tris 20 mM, pH7,5, NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 2 mM, β-glicerofosfato 2 mM, pirofosfato de sodio 40 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 4 mM (añadir en el momento del uso), Triton X-100 al 2 % (Sigma T9284), glicerol al 20 % (EM Science GX0185-6), SDS al 0,2 % (Bio-Rad n.º 161-0416), desoxicolato al 1,0 % (Sigma D5670), 2x de cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma P2714, disuelto en 10 ml de PBS para dar una concentración de 10X, añadir en el momento del uso)). Se incubaron las placas en hielo durante 1 hora y el lisado de cada pocillo se mezcló pipeteando arriba y abajo 5-6 veces. Se determinaron los niveles de fosforilación de STAT3 mediante ELISA (PATHSCAN® Phospho-STAT3 ELISA Antibody Pair, Cell Signaling n.º 7146).

Se revisitaron las placas ELISA con 100 µl/pocillo de una dilución 1:100 de anticuerpo de captura en PBS y se incubaron al menos durante una noche a 4 °C. En el día del uso, las placas se lavaron 3X con tampón de lavado (PBS (Gibco n.º 14190) + Tween 20 al 0,05 %). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de ensayo 1 (AB1) (PBS + BSA al 1 % + Tween 20 al 0,1 % (Bio-Rad n.º 161-0416)) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X y se añadieron 90 µl/pocillo de tampón AB1. Se añadieron 10 µl/pocillo de muestra de ensayo o patrones se añadieron seguido de 100 µl/pocillo de una dilución 1:100 de anticuerpo de detección en tampón AB1. Se incubaron las placas durante una noche a 4 °C y a continuación se lavaron 6X. Se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:1000 de anticuerpo unido a HRP dirigido contra IgG de ratón en tampón AB1 a cada pocillo y se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 6X. Se añadieron 100 µl de una mezcla 1:1 de sustrato de peroxidasa TMB (KPL n.º 50-76-01) y solución sustrato de peroxidasa (KPL n.º 50-65-00) y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10-30 min. Se detuvo la reacción con 100 µl/pocillo de IN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se leyeron las placas a 450 nm con corrección a 650 nm en 30 min.

Se prepararon los patrones de pSTAT3 a partir de células TF-1 estimuladas con IL-6. Las células TF-1 se lavaron 3X y se volvieron a suspender a  $1 \times 10^6$  células/ ml y se dejaron reposar durante una noche sin GM-CSF a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron 1X y se volvieron a suspender a  $5 \times 10^6$  células/ ml. Se añadió IL-6 a 20 ng/ ml y se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 15 minutos, se centrifugaron 4 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 150 µl de tampón de lisis para cada  $5 \times 10^6$  células y se incubaron en hielo durante 60 minutos. Usando una jeringuilla ajustada con una aguja de calibre 21, los lisados se pasaron 6 veces a través de la aguja. Se transfirieron los lisados a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 14K rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se combinaron y se congelaron las alícuotas en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Se asignó al lisado un valor de 100 unidades/ ml de pSTAT3 y se utilizó como un patrón en el ensayo ELISA pSTAT3. Se diluyeron los patrones en una dilución en serie 1:2 usando una mezcla 1:1 de tampón de lisis 2X y medio.

Fosforilación de STAT5A inducida por EPO en células TF-1

Se arrastraron células TF-1 en medio de cultivo celular (RPMI con suero de feto de bovino al 10 % (Summit Biotechnology #RS-50-05), 100 U/ ml de penicilina y 100 µg/ ml de estreptomina (Gibco n.º 14140-122)) + 2 ng/ ml GM-CSF (R&D n.º 215GM). En el día antes del uso las células se lavaron 3X, se volvieron a suspender a  $1 \times 10^6$  células/ ml en medio sin GM-CSF y se dejaron reposar durante la noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron 1X y se volvieron a suspender en medio a  $2,78 \times 10^6$  células/ ml. Se prepararon los compuestos como en la fosforilación de STAT3 inducida por IL-2 en el ensayo de blastos PHA.

Se añadieron 173 µl/pocillo de una suspensión de células TF-1 a  $2,78 \times 10^6$  células/ ml a cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de fondo redondeado (FALCON® #353077) seguido de 12 µl de la dilución del compuesto intermedio o DMSO para pocillos sin compuesto. La placa se incubó a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 30 minutos. Se añadieron 15 µl de 13.33 unidades/ ml de EPO humano recombinante (R&D #287-TC) en medio se a cada pocillo o

medio solo a los pocillos del control negativo. Las placas se mezclaron en un agitador orbital durante 1 minuto y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante un total de 10 minutos. Las placas se centrifugaron 4 minutos a 1500rpm y se retiraron 150 µl del sobrenadante del cultivo de cada pocillo dejando el aglomerado intacto. Las placas se mezclaron en un agitador orbital durante 1 minuto y se añadieron 50 µl de tampón de lisis 2X (Tris 20 mM, pH7,5, NaCl 0,2 M, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 2 mM, β-glicerofosfato 2 mM, pirofosfato de sodio 40 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 4 mM (añadir en el momento del uso), Triton X-100 al 2 % (Sigma T9284), glicerol al 20 % (EM Science GX0185-6), SDS al 0,2 % (Bio-Rad n.º 161-0416), desoxicolato al 1,0 % (Sigma D5670), 2x de cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma P2714, disuelto en 10 ml de PBS para dar una concentración de 10X, añadir en el momento del uso)). Se incubaron las placas en hielo durante 1 hora y el lisado de cada pocillo se mezcló pipeteando arriba y abajo 5-6 veces. Se determinaron los niveles de fosforilación de STAT5A mediante ELISA.

Se revistieron placas ELISA (NUNC® #439454) con 100 µl/pocillo de una dilución 1:500 de anticuerpo de captura (Invitrogen n.º 13-3600) en tampón de carbonato/bicarbonato (Sigma n.º C3041) y se incubaron al menos durante una noche a 4 °C. en el día del uso las placas se lavaron 3X con tampón de lavado (PBS (Gibco n.º 14190) + 0,05 % Tween 20 (Bio-Rad n.º 170-6531)). Se bloquearon las placas con 200 µl/pocillo de tampón de ensayo 2 (AB2) (PBS + BSA al 2 % (Sigma n.º A-9576) + Tween 20 a 0,1 % (Bio-Rad n.º 161-0416)) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3X y se añadieron 90 µl/pocillo de tampón AB2. Se añadieron 10 µl/pocillo de muestra de ensayo o patrones seguido de 100 µl/pocillo de una dilución 1:4000 de anticuerpo de detección (Genway n.º 18-785-210434) en tampón AB2. Se incubaron las placas durante una noche a 4 °C y a continuación se lavaron 6X. Se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1:3000 de anticuerpo de cabra unido a HRP-dirigido contra IgG de conejo (Invitrogen n.º 65-6120 en tampón AB2 a cada pocillo y se incubaron las placas 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas 6X. Se añadieron 100 µl de una mezcla 1:1 de sustrato de peroxidasa TMB (KPL n.º 50-76-01) y solución sustrato de peroxidasa (KPL n.º 50-65-00) y se incubaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10-30 minutos. Se detuvo la reacción con 100 µl/pocillo de IN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se leyeron las placas a 450 nm con corrección a 650 nm en 30 min. Se prepararon patrones pSTAT5A procedentes de células TF-1 estimuladas GM-CSF. Las células TF-1 se lavaron 3X y se volvieron a suspender a 1x10<sup>6</sup> células/ ml y se dejaron reposar durante una noche sin GM-CSF a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron 1X y se volvieron a suspender a 5x10<sup>6</sup> células/ ml. Se añadió GM-CSF a 50 ng/ ml y se incubaron las células a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 15 minutos, se centrifugaron 4 minutos a 1500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 150 µl de tampón de lisis para cada 5x10<sup>6</sup> células y se incubaron en hielo durante 60 minutos. Usando una jeringuilla ajustada con una aguja de calibre 21, los lisados se pasaron 6 veces a través de la aguja. Se transfirieron los lisados a tubos de microcentrifuga y se centrifugaron a 14K rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se combinaron y se congelaron las alícuotas en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Se asignó al lisado un valor de 100 unidades/ ml de pSTAT5A y se utilizó como un patrón en el ensayo ELISA pSTAT5A. Se diluyeron los patrones en una dilución en serie 1:2 usando una mezcla 1:1 de tampón de lisis 2X y medio.

#### Fosforilación de STAT3 inducida por IFNα en blastos PHA

La fosforilación de STAT3 inducida por IFNα en blastos PHA se realizó exactamente como la fosforilación de STAT3 inducida por IL-2 en el ensayo de blastos PHA excepto que las células se estimularon con 15 µl/pocillo de 13,333 unidades/ ml de IFNα2a (R&D n.º 11105-1) en medio.

#### Ensayo de fosforilación de la cadena ligera de miosina (pMLC)

Se cultivaron células A7r5 del músculo liso aórtico de ratón en medio DMEM completo (Gibco n.º de cat. 11995) sustituido con FBS al 10 % (Gibco n.º de cat. SH30071) y penicilina/estreptomina al 1 % (Gibco n.º de cat. 15140). Se sembraron en placas 1,5 X 10<sup>3</sup> células en placas de cultivo de tejidos de 384 pocillos (Becton Dickinson n.º de cat. 3962) y se incubaron durante una noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación se incubaron las células con compuestos de ensayo (diluidos en serie 3 veces con concentraciones finales que varían de 20 µM a 340 pM) durante 60 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se retiró el medio de cultivo celular y se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % (JT Baker n.º de cat. 2106) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la retirada del reactivo de fijación, se añadió tampón de permeabilización 1X (Thermo n.º de cat. 1860291) durante 10 min de incubación a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de permeabilización y se añadió solución de bloqueo 1X (Thermo n.º de cat. 1860291) durante 60 min de incubación a temperatura ambiente. Se retiró la solución de bloqueo y se incubaron las células durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario dirigido contra pMLC (Cell Signaling n.º de cat. 3674) diluido en tampón de bloqueo 1X para una concentración final de 70 ng/ ml. Se retiró el anticuerpo primario seguido de 3 lavados con PBS 1X (Gibco n.º de cat. 14190). Se incubaron las células durante 60 min a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de cabra unido a AlexaFluor 488 dirigido contra IgG de conejo (H + I) (Invitrogen Molecular Probes n.º de cat. A11008) a una concentración final de 5 µg/ ml en tampón de bloqueo 1X mezclado con tinción nuclear de Hoechst (Invitrogen Molecular Probes n.º de cat. H3570) a una concentración final de 5 µg/ ml. A continuación se lavaron las células 3 veces con PBS 1X para retirar los reactivos. Las placas que contenían 30 µl de PBS 1X por pocillo se escanearon a continuación en el formador de imágenes Cellomics ARRAYSCAN® usando la Cell Health Profiling BioApplication. Se usó la Intensidad promedio de la mancha anular media del canal FITC como la lectura final para calcular los valores de la CI<sub>50</sub>. Se determinó un 0 % de inhibición con DMSO al 0,2 % y se determinó una inhibición del 100 % con 1mM del inhibidor de la quinasa Rho H-1152P (Calbiochem n.º de cat. 555550).

## ES 2 666 353 T3

Se han ensayado los Ejemplos en el presente documento y se ha encontrado que tienen actividad menor o igual a 1 en al menos uno de los ensayos JAK3 descritos anteriormente. Los compuestos relacionados en la Tabla 1 se han ensayado en los ensayos anteriores con los resultados indicados.

5

Tabla 1

N.º de ejemplo	JAK3 CI <sub>50</sub> (µM)	JAK1 CI <sub>50</sub> (µM)
1	0,0013	0,0040
2	0,0010	0,0057
3	0,0013	0,0083
4	0,0011	0,0053
5	0,0010	0,0205
6	0,0010	0,0067
7	0,0012	0,0186
8	0,0013	0,0193
9	0,0031	0,0069
10	0,0012	0,0043
11	0,0009	0,0057
12	0,0015	0,0169
13	0,0012	0,0033
14	0,0006	0,0024
15	0,0010	0,0056
16	0,0014	0,0096
17	0,0015	0,0017
18	0,0015	0,0042
19	0,0050	0,0089
20	0,0020	0,0042
21	0,0013	0,0022
22	0,0084	0,0129
23	0,0025	0,0025
24	0,0018	0,0027
25	0,0016	0,0011
26	0,0008	0,0006
27	0,0012	0,0018
28	0,0007	0,0011
29	0,0029	0,0042
30	0,0011	0,0008
31	0,0030	0,0024
32	0,0018	0,0022
33	0,0036	0,0071
34	0,0044	0,0097
35	0,0009	0,0014
36	0,0010	0,0068
37	0,0016	0,0148
38	0,0010	0,0050
39	0,0006	0,0038
40	0,0011	0,0028
41	0,0020	0,0061
42	0,0010	0,0044
43	0,0006	0,0043
44	0,0016	0,0123
45	0,0007	0,0058
46	0,0017	0,0079
47	0,0009	0,0059
48	0,0007	0,0039
49	0,0010	0,0090
50	0,0011	0,0039
51	0,0010	0,0059
52	0,0005	0,0023
53	0,0006	0,0003
54	0,0005	0,0004
55	0,0005	0,0002
56	0,0040	0,0020
57	0,0045	0,0040

58	0,0034	0,0037
59	0,0025	0,0030
60	0,0037	0,0037
61	0,0137	0,0031
62	0,0015	0,0003
63	0,0051	0,0012
64	0,0010	0,0004
65	0,0023	0,0036
66	0,0013	0,0116
67	0,0012	0,0080
68	0,0008	0,0089
69	0,0008	0,0058
70	0,0022	0,0010
71	0,0250	0,0198
72	0,0005	0,0030
73	0,0006	0,0042
74	0,0007	0,0050
75	0,0007	0,0067
76	0,0160	0,0013

## MÉTODOS DE PREPARACIÓN

5 Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse por cualquier método disponible para los expertos en la materia de la química orgánica. Los esquemas sintéticos generales para preparar compuestos de la presente invención se describen a continuación. Estos esquemas son ilustrativos y no pretenden limitar las posibles técnicas que un experto en la materia puede usar para preparar los compuestos divulgados en el presente documento. Serán evidentes para los expertos en la materia métodos diferentes para preparar los compuestos de la presente invención. Además, las diversas etapas de la síntesis pueden realizarse en una secuencia alternativa para dar el compuesto o los compuestos deseados.

15 Los ejemplos de compuestos de la presente invención preparados por los métodos descritos en los esquemas generales se dan en las secciones de preparaciones y ejemplos y compuestos intermedios expuestas más adelante en el presente documento. Los compuestos de ejemplo se preparan de forma típica como mezclas racémicas. La preparación de ejemplos homoquirales puede realizarse por técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse compuestos homoquirales por separación de productos racémicos por HPLC preparativa de fase quiral. Como alternativa, los compuestos de ejemplo pueden prepararse por métodos conocidos para dar productos enantioméricamente enriquecidos. Estos incluyen, aunque no de forma limitativa, la incorporación de funcionalidades auxiliares quirales a compuestos intermedios racémicos que sirven para controlar la diaestereoselectividad de las transformaciones, proporcionando productos enantioenriquecidos tras la escisión del auxiliar quiral.

## Abreviaturas

Ac	acetilo
ACN	acetonitrilo
AcOH u HOAc	ácido acético
ac.	acuoso
anhyd.	anhidro
ATP	adenosina trifosfato
Bn	bencilo
Bu	butilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio
CDI	carbonyldiimidazol
°C	grados centígrados
Cbz	carbobenciloxi
Conc.	concentrado
d	días
DAST	trifluoruro de (dietilamino)azufre
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno
DCE	1,2-dicloroetano
DCM	diclorometano
DEA	dietilamina
DIEA o DIPEA	diisopropiletilamina
DMAP	dimetilaminopiridina

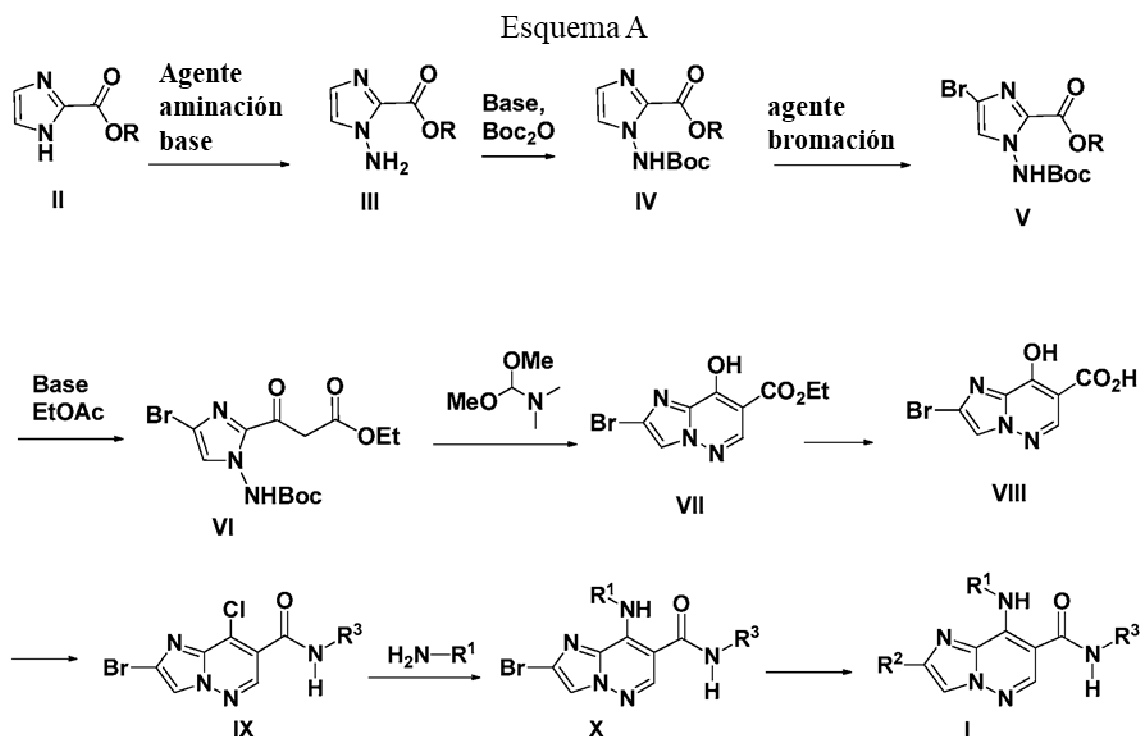
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPA	difenilfosforilazida
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno
DTT	ditiotreitól
EDC o EDCI o EDAC	clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol
%ee	porcentaje de exceso enantiomérico
(+/-) o (±)	racémico
eq. o Eq. o equiv.	equivalentes
EtOAc o EA	Acetato de etilo
Et	Etilo
EtOH	Etanol
Ej.	Ejemplo
GST	glutación S-transferasa
H	Hidrógeno
HATU	Hexafluorofosfato de <i>N,N,N,N</i> -tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uranio
hex	hexanos
HIS	histidina
h o hr	Horas
I	iso
IPA	isopropanol
Hz	hertz
MHz	megahertz
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta presión en fase invertida
HOBT	Hidrato de 1-hidroxibenzotriazol
Reactivo de Lawesson	[2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetano-2,4-disufuro
LC	cromatografía líquida
LCMS o LC/MS	cromatografía líquida con espectrometría de masas
LDA	diisopropilamida de litio
m-CPBA o MCPBA	ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
Me	metilo
MeOH	metanol
min.	minutos
M+	(M+H) <sup>+</sup>
M <sup>+1</sup>	(M+H) <sup>+</sup>
MS	espectrometría de masas
MSA	ácido metanosulfónico
MTBE	metil <i>terc</i> -butil éter
<i>m/z</i>	relación masa-carga
N	Normal
NMP	N-metilpirrolidinona
RMN	resonancia magnética nuclear
PBMC	células mononucleares de sangre periférica
PhCONCS	isotiocianato de benzoilo
Pd/C	paladio sobre carbono
Ph	fenilo
Pr	propilo
PHA	fitohemaglutinina
ppm	partes por millón
PSI o psi	libras por pulgada cuadrada
cuant.	cuantitativo
Tiempo ret o Tr	tiempo de retención
ta o TA	temperatura ambiente
sat. o satd.	saturado
s	segundos
SFC	fluido super crítico
S-Tol-BINAP	(S)-(-)-2,2'-Bis(di- <i>p</i> -tolilfosfino)-1,1'-binaftilo
Mat. part. o mat. part.	Material de partida
<i>t</i>	<i>terc</i>
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético

THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía de capa fina
TMS-I o TMSI	yodotrimetilsilano
p-TSA	ácido <i>para</i> -toluenosulfónico
Xantphos	(9,9-dimetil-9H-xanteno-4,5-diil)bis[difenilfosfina]
t	tripleto
m	multipleto
s	singleto
d	dobleto
s.a.	singleto ancho
dd	dobleto de dobletes
tt	tripleto de tripletes
ddd	dobleto de dobleto de dobletes
c	cuarteto
quin.	Quinteto
P/V o p/v	peso a volumen
X-Phos	diciclohexil(2',4',6'-triisopropilbifenil-2-il)fosfina

5 Los compuestos de fórmula I pueden prepararse mediante los procesos descritos en el presente documento en los siguientes Esquemas de reacción. Los ejemplos de reactivos y procedimientos adecuados para realizar estas reacciones aparecen más adelante en el presente documento y en los ejemplos de trabajo incluidos en el presente documento. La protección y la desprotección en los esquemas del presente documento se pueden llevar a cabo mediante procedimientos conocidos generalmente en la materia (véase, por ejemplo, Greene, T.W. et al., *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edición, Wiley (1999)).

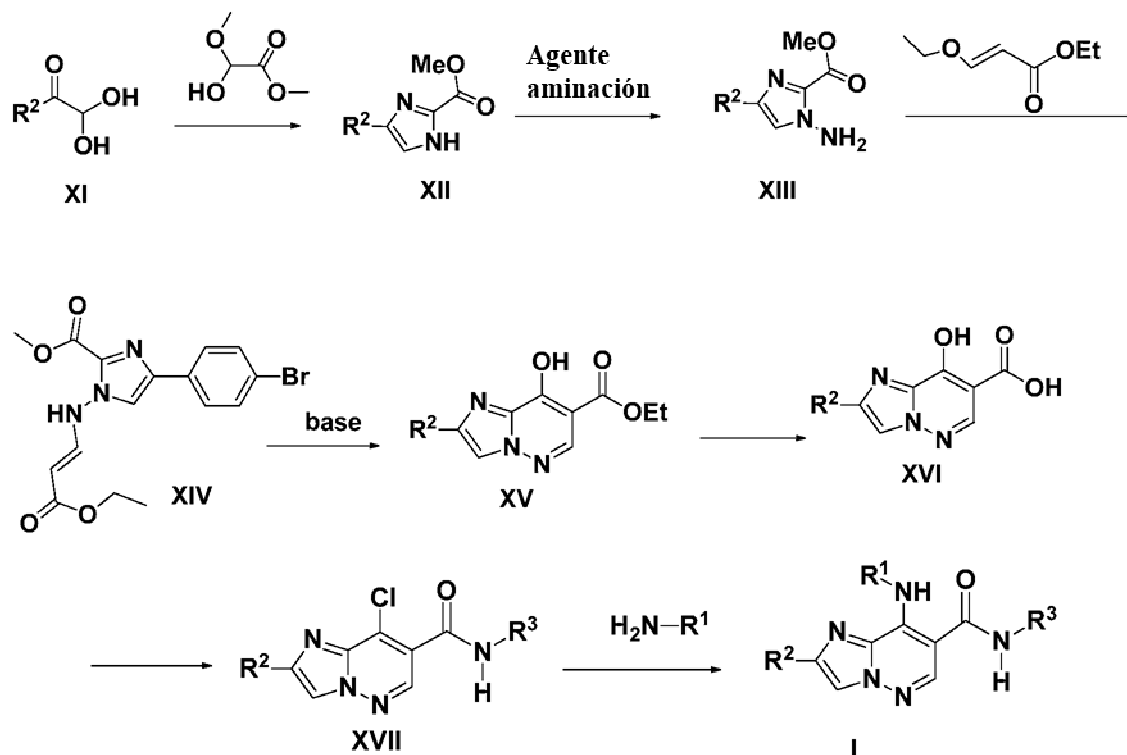
10 Los compuestos de la fórmula I se pueden preparar a partir de imidazol de la fórmula II tal como se representa gráficamente en el Esquema A. El imidazol de fórmula II se puede obtener mediante procesos conocidos en la técnica. La reacción de un imidazol de fórmula II en la que R<sup>2</sup> es como se ha definido anteriormente con un reactivo de aminación, tal como cloraminas u óxido de (aminooxi)difenilfosfina, en presencia de una base, tal como hidruro sódico o bis(trimetilsilil)amida de litio, en un disolvente, tal como DMF, da como resultado el imidazol aminado de fórmula III. Los compuestos de fórmula III se pueden proteger en N mediante reacción con dicarbonato de di-*tert*-butilo para proporcionar un compuesto de fórmula IV. Los compuestos de fórmula IV se pueden bromar con un agente de bromación, tal como bromo o N-bromosuccinimida, en un disolvente, tal como DMF, para dar como resultado un compuesto de fórmula V como producto principal. Los compuestos de fórmula V pueden reaccionar con acetato de etilo en presencia de una base, tal como *tert*-butóxido de potasio en un disolvente tal como THF, para dar como resultado un compuesto de fórmula VI. La reacción de los compuestos de fórmula VI con 1,1-dimetoxi-*N,N*-dimetilmetanamina (DMF-DMA) en un disolvente tal como DCM, a temperatura ambiente da como resultado productos ciclados de la fórmula VII. Los compuestos de fórmula VII pueden hidrolizarse con agentes de hidrólisis, tales como hidróxido de litio o hidróxido de potasio, en un disolvente protónico, tal como etanol y agua, a temperatura elevada comprendida de 45 - 100 °C para proporcionar un compuesto de fórmula VIII. La reacción de los compuestos de fórmula VIII con un agente de cloración, tal como oxiclورو de fósforo o cloruro de tionilo, seguido de inactivación del compuesto intermedio obtenido con una amina nucleófila de la fórmula R<sup>3</sup>NH<sub>2</sub>, tal como amoniaco (R<sup>3</sup> = H), a una temperatura comprendida de -40 °C a 0 °C da como resultado productos de la fórmula IX. Los compuestos de la fórmula IX se pueden acoplar a continuación con aminas de la fórmula R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> en presencia de una base adecuada en un disolvente adecuado para proporcionar compuestos de la fórmula X, que son compuestos de la fórmula I en la que R<sup>2</sup> es bromo. Los ejemplos de bases adecuadas para el acoplamiento incluyen NaH, Et<sub>3</sub>N, DIPEA, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y los disolventes adecuados THF, CH<sub>3</sub>CN, DMF, NMP, DMA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La base más preferida es DIPEA y los disolventes más preferidos incluyen DMF, NMP, y DMA.

35 Los compuestos de la fórmula X se pueden hacer reaccionar ácidos borónicos de la fórmula R<sub>2</sub>B(OH)<sub>2</sub> o ésteres de boronato de la fórmula R<sub>2</sub>B(OR)<sub>2</sub> en condiciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura que son bien conocidas de los expertos en la materia, para dar como resultado de la fórmula I, en la que R<sup>2</sup> es arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.



El Esquema B representa gráficamente una ruta alternativa para la síntesis de compuestos de la fórmula I partiendo de compuestos de la fórmula XI. De acuerdo con un procedimiento de la bibliografía (publicación de Estados Unidos n.º 2010/0016303A1), los compuestos de fórmula XI, en la que R<sup>2</sup> es arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, pueden reaccionar con 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo en presencia de acetato amónico y ácido acético para proporcionar el imidazol de fórmula XII. La reacción de los imidazoles de la fórmula VIII con un reactivo de aminación tal como se describe en el Esquema A da como resultado compuestos de la fórmula XIII. Los compuestos de la fórmula XIII se pueden condensar con 3-etoxiacrilato de etilo en presencia de un catalizador ácido, tal como p-TSA, en un disolvente adecuado, tal como etanol, para dar como resultado compuestos de la fórmula XIV, seguido de ciclación inducida por base que utiliza una base tal como DBU, en un disolvente tal como etanol para proporcionar compuestos de la fórmula XV. La reacción de los compuestos de la fórmula XV con un reactivo de hidrólisis como se ha descrito anteriormente en el Esquema A da como resultado compuestos de fórmula XVI. La reacción de los compuestos de fórmula XVI con un agente de cloración, seguido de inactivación del compuesto intermedio obtenido con una amina nucleófila de la fórmula R<sup>3</sup>NH<sub>2</sub>, tal como amoniaco (R<sup>3</sup> = H) tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema A da como resultado productos de la fórmula XVII, que se pueden acoplar con aminas de la fórmula R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema A para proporcionar compuestos de la fórmula I, en la que R<sup>2</sup> es arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

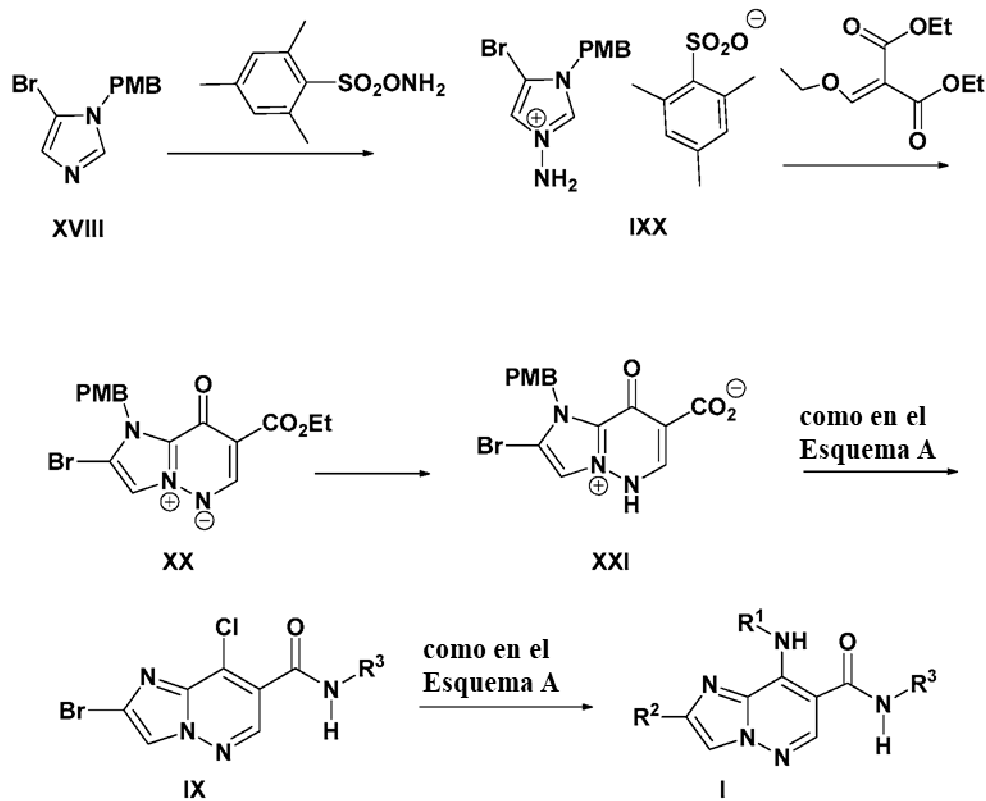
## Esquema B



El Esquema C representa gráficamente una ruta alternativa para la síntesis de compuestos de la fórmula I mediante el compuesto intermedio XXI, que se puede preparar partiendo de imidazol de la fórmula XVIII siguiendo un procedimiento análogo al descrito en la bibliografía (Chem. Pharm. Bull., 454 (1994)). El imidazol de fórmula XVIII se puede obtener mediante procesos conocidos en la técnica, tal como reacción con cloruro de 4-metoxibencilo en presencia de hidróxido sódico. El imidazol de la fórmula XVIII se puede mezclar con O-(mesitilsulfonyl)hidroxilamina en un disolvente adecuado tal como DCM para proporcionar la sal de imidazolio de fórmula IXX. Los compuestos de fórmula IXX se pueden condensar con 2-(etoximetileno)malonato de dietilo en presencia de una base tal como carbonato potásico a temperatura elevada para proporcionar el producto ciclado de fórmula XX. Los compuestos de fórmula XX puede hidrolizarse con agentes de hidrólisis, tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema A, para dar como resultado Compuestos de fórmula XXI. La reacción de los compuestos de fórmula XXI con un agente de cloración, seguido de inactivación del compuesto intermedio obtenido con una amina nucleófila de la fórmula  $\text{R}^3\text{NH}_2$ , tal como amoníaco ( $\text{R}^3 = \text{H}$ ) tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema A, da como resultado productos de la fórmula IX, que se pueden acoplar con aminas de la fórmula  $\text{R}^1\text{NH}_2$  tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema A para proporcionar compuestos de la fórmula I, en la que  $\text{R}^2$  es arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

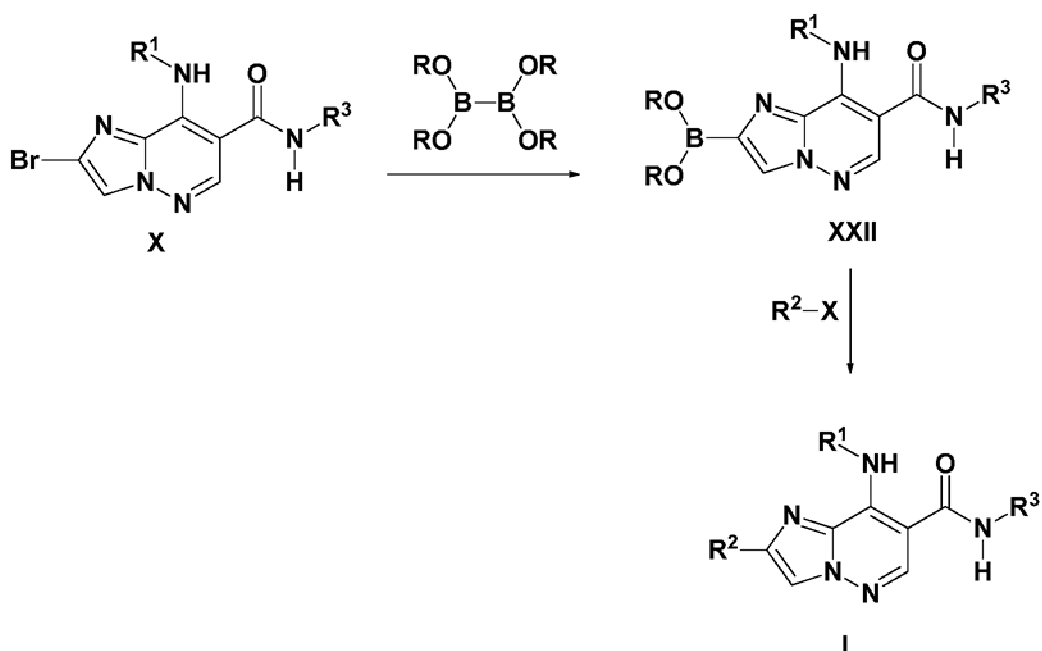


## Esquema C



5 Como se representa gráficamente en el Esquema D, los compuestos de la fórmula I se pueden preparar haciendo reaccionar compuestos de la fórmula X con diboranos de fórmula general  $(RO)_2B-B(OR)_2$  en condiciones catalizadas con palacio fácilmente conocidas de los expertos en la materia para proporcionar compuestos de la fórmula XXII. Los compuestos de la fórmula XXII se pueden acoplar a continuación con reactivos del tipo  $R^2-X$ , donde X es muy habitualmente cloro, bromo, o trifluorometanosulfonato para proporcionar compuestos de la fórmula I, en la que  $R^2$  es arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido.

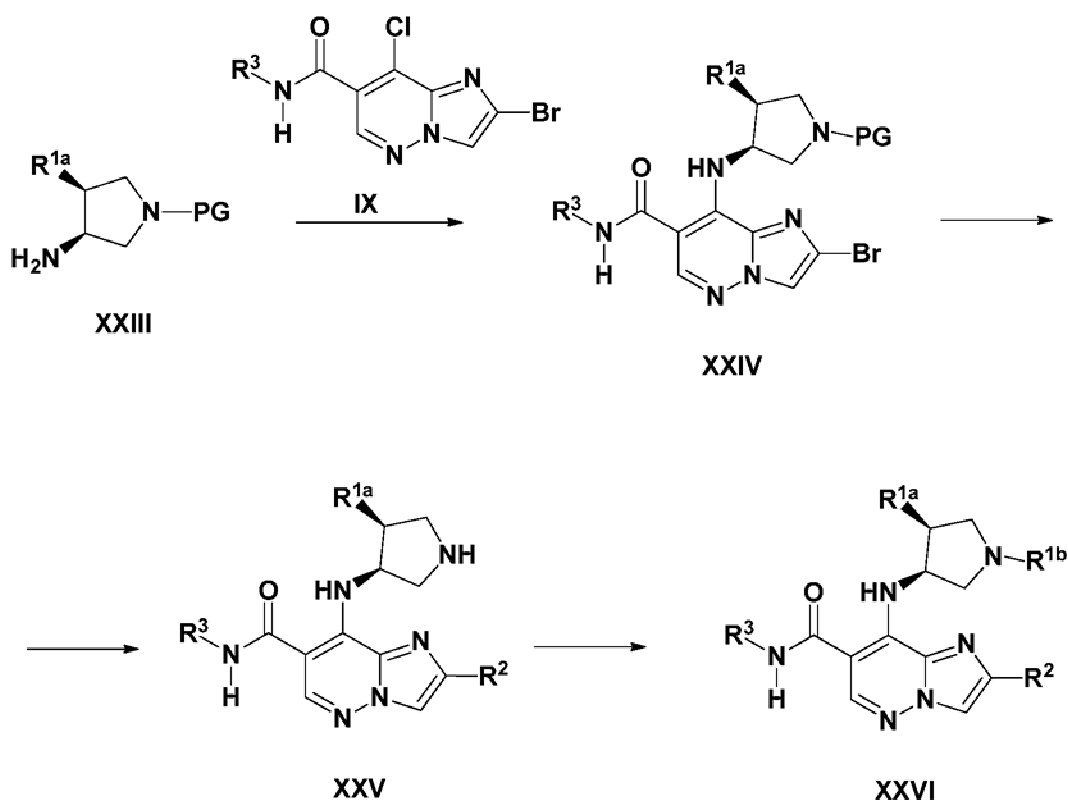
## Esquema D



Como se representa gráficamente en el Esquema E, los compuestos de pirrolidina de la fórmula XXVI se pueden preparar a partir del acoplamiento de los compuestos intermedios de pirrolidina de la fórmula XXIII con compuestos de la fórmula IX (preparados como en el Esquema A) para proporcionar compuestos de la fórmula XXIV donde PG es un grupo protector adecuado, tal como *tert*-butoxicarbonilo (Boc) o benciloxicarbonilo (Cbz). Los compuestos de la fórmula XXIV se pueden funcionalizar con un grupo R<sup>2</sup> adecuado por métodos conocidos en la técnica, y por métodos descritos en el presente documento, seguido de desprotección (eliminación del PG) usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar compuestos de la fórmula XXV. Los compuestos de la fórmula XXV se pueden funcionalizar con grupos R<sup>1b</sup> adecuados por métodos conocidos en la técnica y mediante el uso de métodos descritos en el presente documento para proporcionar compuestos de la fórmula XXVI.

10

Esquema E



Los compuestos intermedios de pirrolidina adecuadamente sustituidos representados por R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> se pueden preparar por métodos conocidos de los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Targets en Heterocyclic Synthesis, 13:147-171 (2009) y Tetrahedron, 60(8):1701-1729 (2004) y las referencias citadas en los mismos). Más específicamente, tal como se representa gráficamente en el Esquema F, compuestos intermedios de pirrolidina adecuadamente sustituidos de la fórmula XXXI se pueden preparar a partir de compuestos de la fórmula XXVII donde PG es un grupo protector adecuado (PG) tal como butoxicarbonilo (Boc) o benciloxicarbonilo (Cbz). La oxidación usando reactivos oxidantes adecuados, tal como mCPBA, da como resultado compuestos de la fórmula XXVIII seguido de apertura de epóxido con reactivos nucleófilos, tales como alquilo de Grignard en presencia de una sal de cobre, tal como yoduro de cobre, da como resultado compuestos de la fórmula IXXX en la que R<sup>1a</sup> es un grupo alquilo adecuado. Como alternativa, la reacción de compuestos de la fórmula XVIII con alcoholes, tal como metanol, en presencia de un catalizador de ácido adecuado, tal como ácido sulfúrico, da como resultado compuestos de la fórmula IXXX en la que R<sup>1a</sup> es un grupo alcoxi adecuado. Los compuestos de la fórmula IXXX se pueden hacer reaccionar a continuación con reactivos de activación adecuados, tal como cloruro de toluenosulfonilo, en presencia de una base adecuada, tal como piridina, en presencia de un disolvente adecuado tal como diclorometano, seguido de reacción del compuesto intermedio de alcohol activado con un reactivo de azida adecuado, tal como azida de sodio, para dar como resultado compuestos de la fórmula XXX. Los compuestos de la fórmula XXX se pueden hacer reaccionar con un agente de reducción adecuado, tal como trifenilfosfina, en un disolvente adecuado para proporcionar compuestos de pirrolidina de la fórmula XXXI. Los compuestos enantiopuros de la fórmula XIII que tienen la configuración 3-(S) preferida se pueden obtener mediante resolución usando métodos de cromatografía quiral que son conocidos por los expertos en la técnica.

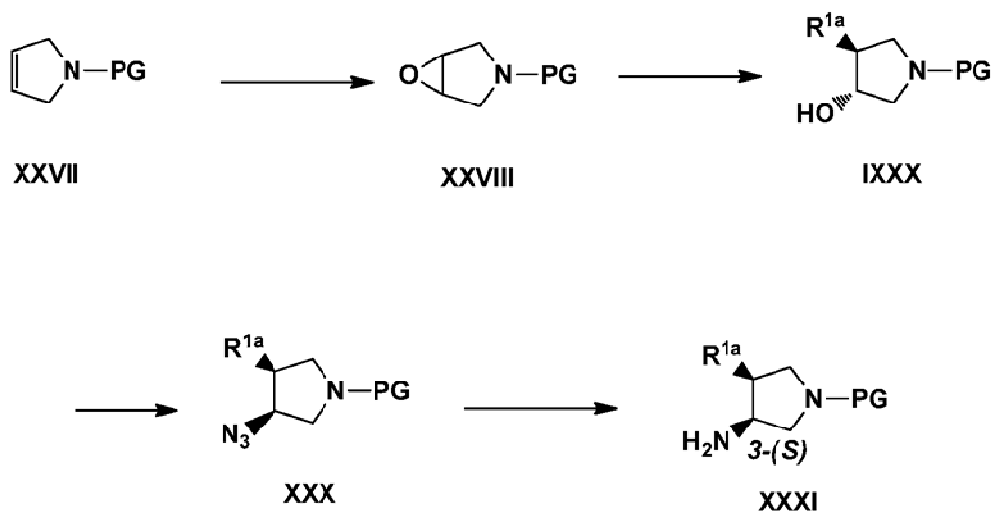
15

20

25

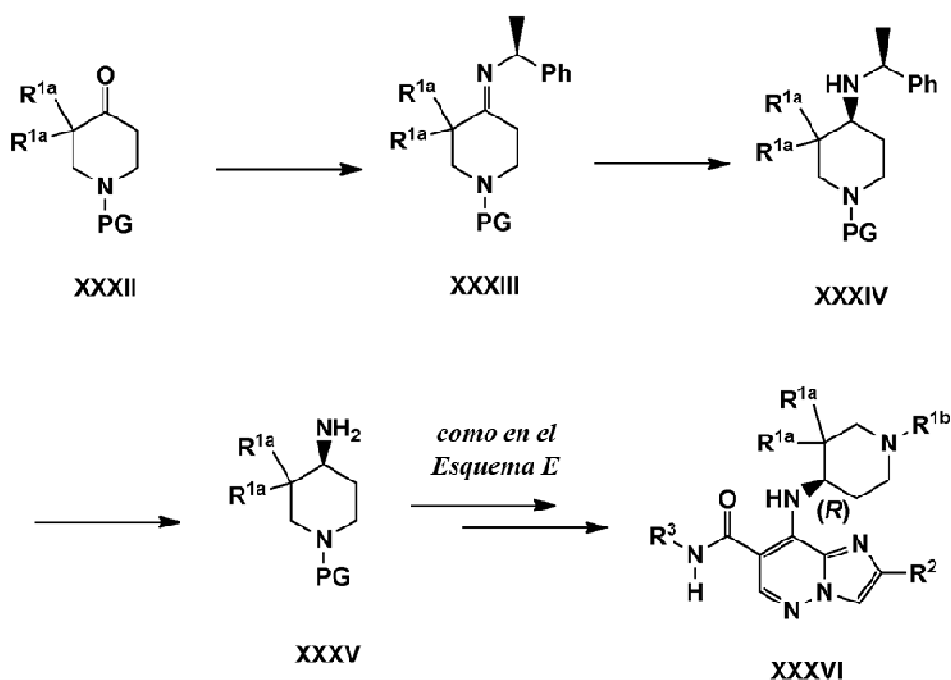
30

## Esquema F



Los compuestos intermedios de piperidina adecuadamente sustituidos representados por  $R^1NH_2$  se pueden preparar por métodos conocidos de los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Targets en Heterocyclic Synthesis, 13:147-171 (2009) y Tetrahedron, 60(8):1701-1729 (2004) y las referencias citadas en los mismos). Más específicamente, tal como se representa gráficamente en el Esquema G, compuestos intermedios de piperidina adecuadamente sustituidos de la fórmula XXXVI se pueden preparar a partir de compuestos de la fórmula XXXII donde PG es un grupo protector adecuado (PG) tal como butoxicarbonilo (Boc) o benciloxicarbonilo (Cbz). La reacción con  $\alpha$ -metilbencilamina en un disolvente adecuado, tal como benceno, en presencia de un secuestrante de agua, tal como tamices moleculares, da como resultado compuestos de imina de la fórmula XXXIII. La reducción de las iminas usando un agente reductor adecuado, tal como borohidruro sódico, en un disolvente adecuado, tal como etanol, da como resultado aminas de la fórmula XXXIV. La hidrogenolisis usando un catalizador adecuado, tal como hidróxido de paladio sobre carbono, en un disolvente adecuado, tal como ácido acético, en presencia de hidrógeno gaseoso da como resultado aminas de la fórmula XXXV que se pueden transformar en los compuestos finales de la fórmula XXXVI tal como se ha descrito anteriormente en el Esquema E. Los compuestos enantiopuros de la fórmula XXXVI que tienen la configuración (R) preferida se pueden obtener usando (R)- $\alpha$ -metilbencilamina enantiopura en la preparación.

## Esquema G



## ES 2 666 353 T3

### Condiciones de HPLC analítica

- 5 Método A: Columna: PHENOMENEX® Synergy, 4,6 x 50 mm, Fase móvil A: agua/metanol 90:10 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,2 %; Fase móvil B: metanol/agua 90:10 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,2 %; Gradiente: 0-100 % de B durante 4 minutos, después una parada de 1 minuto al 100 % de B; Caudal: 4 ml/min. longitud de onda de detección 220 nm o 254 nm.
- Método B: Columna: YMC COMBISCREEN® ODS-A, 4,6 x 50 mm, Fase móvil: CH<sub>3</sub>OH 10-90 % ac/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,2 %, 4,0 min. gradiente con parada de 1,0 min, Caudal: 4 ml/min, longitud de onda de detección 220 nm o 254 nm.
- 10 Método C: Columna: XBridge C18, 3,5 µm 4,6 x 50 mm, Fase móvil A: agua/metanol 90:10 con TFA al 0,1 %; Fase móvil B: metanol/agua 90:10 con TFA al 0,1 %; Longitud de onda: 254 nm; Gradiente: 0-100 % de B durante 15 minutos, después una parada de 3 minutos al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min; Temperatura: 40 °C.
- 15 Método D: Columna: XBridge Fenil C18, 3,5 µm 4,6 x 50 mm, Fase móvil A: agua/acetonitrilo 95:5 con TFA al 0,05 %; Fase móvil B: acetonitrilo/agua 95:5 con TFA al 0,05 %; Longitud de onda: 254 nm; Gradiente: 0-100 % de B durante 12 minutos, después una parada de 3 minutos al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min.
- Método E: Columna: Walters Xbridge C18, 4,6 x 50 mm, 5 µm, Caudal: 4 ml/min; Disolvente A: acetonitrilo:agua 5:95 con NH<sub>4</sub>OAc 10 mM, Disolvente B: acetonitrilo:agua 95:5 con NH<sub>4</sub>OAc 10 mM; Gradiente lineal de 0 a 100 % Disolvente B durante 4 min, con parada de 1 min a 100 % B.
- 20

### Condiciones de LCMS analítica

- 25 Método A: Columna: BEH C18 2,1 x 50 mm 1,7 µ; Gradiente lineal de 0 -100 % Disolvente B durante 2 min, a continuación parada de 0,5 min al 100 % de B; Caudal: 1 ml/min; Disolvente A: agua 100 % con TFA al 0,05 %; Disolvente B: acetonitrilo 100 % agua con TFA al 0,05 %; Los productos se detectaron a una longitud de onda de 220 con modo de ionización positivo.
- Método B: Columna: Luna C18 4,6x30 mm 3 µ A:10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH
- 30 TFA/B:10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH TFA; 0 %-95 % B en 2 min; caudal 4 ml/min. Producto detectado en modo de ionización positiva.
- Método C: Columna: Luna C18 4,6x30mm 3µ A:H<sub>2</sub>O 10:90 :ACN NH<sub>4</sub>OAc/B:10:90 H<sub>2</sub>O:ACN NH<sub>4</sub>OAc; 0 %-95 % B en 2 min; caudal 4 ml/min. Producto detectado en modo de ionización positiva o negativa.
- 35

### Condiciones de HPLC/LCMS analítica

- 40 Método E: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: acetonitrilo:agua 5:95 con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: acetonitrilo:agua 95:5 con acetato amónico 10 mM; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,75 minuto al 100 % de B; Caudal: 1,11 ml/min.
- Método F: Columna: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 µm; Fase móvil A: acetonitrilo:agua 5:95 con TFA al 0,05 %; Fase móvil B: acetonitrilo:agua 95:5 con TFA al 0,05 %; Temperatura: 50 °C; Gradiente: 0-100 % de B durante 3 minutos, después una parada de 0,75 minuto al 100 % de B; Caudal: 1,11 ml/min. La RMN de protón se adquirió en metanol deuterado:cloroformo 1:1.
- 45

### Condiciones de HPLC preparativa

- 50 Método A: Columna: Luna 5µ C18 30 x 100 mm; Caudal = 40 ml/min; Disolvente A = 10 % MeOH - 90 % H<sub>2</sub>O - 0,1 % TFA; Disolvente B = 90 % MeOH - 10 % H<sub>2</sub>O - 0,1 % TFA, %InicialB = 0-30, %FinalB = 80-100, tiempo de gradiente lineal = 10 -12 min; Prods. detectados a longitud de onda 220.

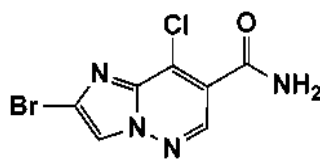
### 55 Condiciones de LC/MS preparativa

- Método A: Columna: Waters XBridge C18, 19 x 150 mm, partículas de 5 µm; Precolumna: Waters XBridge C18, 19 x 10 mm, partículas de 5 µm; Fase móvil A: de acetonitrilo:agua 5:95 con acetato amónico 10 mM; Fase móvil B: de acetonitrilo:agua 95:5 con acetato amónico 10 mM; Gradiente: 5-100 % de B durante 15 minutos, después una parada de 5 minutos al 100 % de B; Caudal: 20 ml/min.
- 60

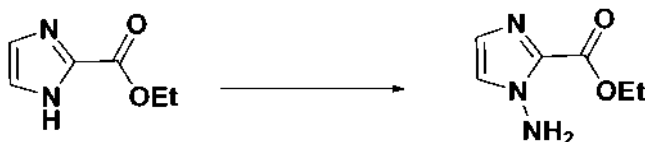
## COMPUESTOS INTERMEDIOS

### Intermedio 1

65



Etapa 1: 1-Amino-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo



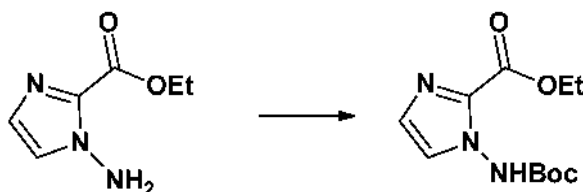
5

A una solución de 1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (2,00 g, 14,27 mmol) en DMF (40 ml) a 0 °C se añadió hidruro sódico (0,714 g, 17,84 mmol, 60 % en peso). La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 120 min y después se enfrió a 0 °C. Una suspensión de óxido de (aminooxi)difenilfosfina [4,66 g, 19,98 mmol, preparada a partir de cloruro difenilfosfínico según un procedimiento conocido (Org. Lett., 351-353 (2007))], en DMF (70 ml) se añadió a lo anterior. Después de 10 min, el baño de hielo se retiró. La mezcla de reacción se volvió viscosa y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se interrumpió con agua hasta que se convirtió en una solución transparente y se concentró a sequedad a presión reducida. El producto en bruto se suspendió en EtOAc (400 ml) con agitación durante 30 min y se filtró. El filtrado se concentró para dar un sólido viscoso de color amarillo pálido, 2,6 g. El producto en bruto se purificó mediante una columna de gel de sílice (Isco prep: MeOH al 0-5 %-DCM durante 20 minutos) para proporcionar 1-amino-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (1,99 g, rendimiento del 90 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) δ 7,35 (d, *J*=1,3 Hz, 1H), 7,11 (s, 1H), 4,37 (c, *J*=7,3 Hz, 2H), 1,50 (s a, 9H), 1,38 (t, *J*=7,0 Hz, 4H). ESI-MS (LCMS analítica Método A): *m/z* 156,0 ([*M*+*H*]<sup>+</sup>).

Procedimiento alternativo usando LiN(TMS)<sub>2</sub> 1 M como base: Una solución 1 M en THF de LiHMDS (19,62 ml, 19,62 mmol) se añadió gota a gota a una solución de 1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (2,5 g, 17,84 mmol) en DMF (119 ml) a 0 °C. La reacción se agitó a 0 °C durante 10 minutos. Se añadió una suspensión en DMF (119 ml) de óxido de (aminooxi)difenilfosfina (4,99 g, 21,41 mmol). Después de agitar durante 10 minutos, el baño de hielo se retiró, y la agitación continuó a temperatura ambiente. Después de 3 h, el material de partida se había consumido por completo. Se añadió agua en porciones a la mezcla de reacción hasta completar la disolución de la suspensión. La solución transparente se concentró a sequedad a presión reducida. Se añadió acetato de etilo al sólido, formando una suspensión de color amarillo. La suspensión se agitó durante 15 minutos y se filtró. El sólido se lavó con acetato de etilo y diclorometano, sucesivamente. El lavado orgánico recogido se concentró. El producto en bruto se disolvió en MeOH al 10 % en DCM (10 ml) y se cromatografió en una columna de gel de sílice preempaquetada (Isco prep: MeOH al 0-5 %-DCM durante 20 minutos. El producto comenzó a eluir a aproximadamente 7 minutos (MeOH ~2 % en DCM). El 1-amino-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (2,57 g, 16,56 mmol, rendimiento del 93 %) deseado se obtuvo en forma de un sólido de color blanco.

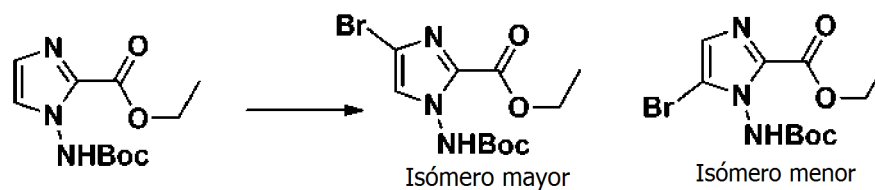
Etapa 2: 1-((*tert*-Butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo

35



A una solución de 1-amino-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (1,776 g, 11,35 mmol) y DMAP (0,699 g, 5,73 mmol) en DMF (18 ml) se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (3,61 ml, 15,55 mmol). La reacción se calentó a 85 °C durante 4 h, y a continuación se evaporó a sequedad a presión reducida. La mezcla del producto en bruto se disolvió en una pequeña cantidad de DCM y se cargó en un cartucho de gel de sílice de 40 g que se eluyó con 10-40 % EtOAc en hexano para dar 1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo en forma de un sólido de color blanco (2,13 g, rendimiento del 72,9 %). LCMS (Método B): *m/z* 256,1 [*M*+1]; HPLC (Método B): Tr 2,163 min. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) δ 7,34 (d, *J*=1,3 Hz, 1H), 7,11 (d, *J*=1,1 Hz, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,37 (c, *J*=7,0 Hz, 2H), 1,49 (s a, 9H), 1,42 - 1,35 (m, 3H). Etapa 3: 4-Bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo

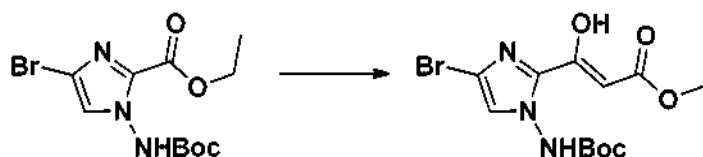
45



Una solución de NBS (1,548 g, 8,70 mmol) en DMF (15 ml) se añadió lentamente mediante un embudo de adición a una solución de 1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (2,22 g, 8,70 mmol) en DMF (12 ml) a temperatura ambiente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A la reacción se añadió una solución saturada de bicarbonato sódico hasta que la solución de color amarillo se convirtió en una suspensión de color blanco. La mezcla se concentró a sequedad. El residuo se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó (salmuera), se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y se concentró para dar un aceite viscoso de color amarillo. El producto en bruto se purificó mediante una columna de gel de sílice (Isco prep: 15-100 % acetato de etilo/hexanos) para proporcionar 4-bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (1,52 g, 4,55 mmol, rendimiento del 52,3 %) en forma de un sólido de color blanco. LCMS (Método B )  $m/z$  334,1 [M+1], Br-patrón; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, cloroformo- $d$ )  $\delta$  7,26 (s, 1H), 4,42 (c,  $J=7,1$  Hz, 2H), 1,51 (s, 9H), 1,42 (t,  $J=7,2$  Hz, 3H).

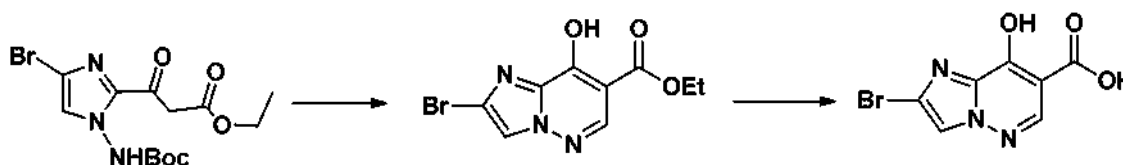
Además, el isómero minoritario (fracción más polar), 5-bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (0,343 g, 1,026 mmol, rendimiento del 11,80 %) y el material de partida recuperado (fracción más polar) 1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (0,236 g, 0,925 mmol, rendimiento del 10,63 %) también se recogieron. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, cloroformo- $d$ )  $\delta$  7,48 (s a, 1H), 7,18 (s, 1H), 4,42 (c,  $J=7,0$  Hz, 2H), 1,51 (s, 9H), 1,42 (t,  $J=7,2$  Hz, 4H).

Etapa 4: 3-(4-Bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-il)-3-oxopropanoato de etilo



A una solución de 4-bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-carboxilato de etilo (1,90 g, 5,69 mmol) en THF (4,4 ml) a 0 °C, se añadió gota a gota una solución enfriada (previamente enfriada a 0 °C) 1 M en THF de *tert*-butóxido de potasio (17,06 ml, 17,06 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 5 minutos. Acetato de etilo seco (1,410 ml, 14,40 mmol), que se había enfriado previamente a 0 °C, se añadió gota a gota. La agitación se continuó a 0 °C durante 15 minutos. El baño de hielo se retiró. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, convirtiéndose en una suspensión de color amarillo más oscuro. La reacción se enfrió a 0 °C, y se trató con HCl 1,0 N mediante adición gota a gota hasta la completa disolución de la suspensión. La reacción se concentró hasta la mitad del volumen a presión reducida, y se diluyó con acetato de etilo. La solución se basificó mediante la adición de NaOH 1,0 N. La capa ac. se volvió a extraer con acetato de etilo (3 x). Los extractos de acetato de etilo se combinaron, se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar 3-(4-bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (1,502 g, 4,00 mmol, rendimiento del 70 %) en forma de un sólido de color amarillo pálido. LCMS (Método B )  $m/z$  376,1 [M+1], Br-patrón; HPLC (Método B): Tr 2,961 min. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD, forma enoato)  $\delta$  7,51 (s, 1H), 4,18 (c,  $J=7,3$  Hz, 2H), 4,00 (s, 1H), 3,97 (s, 1H), 1,49 (s a, 9H), 1,25 (t,  $J=7,2$  Hz, 3H).

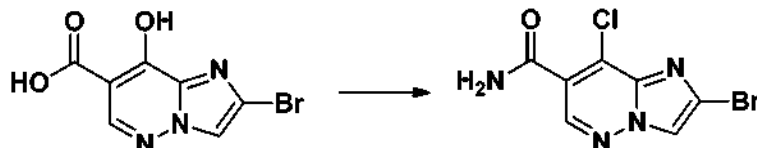
Etapa 5: Ácido 2-bromo-8-hidroxiimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxílico



A una solución de 3-(4-bromo-1-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-1H-imidazol-2-il)-3-oxopropanoato de etilo (1,354 g, 3,60 mmol) en DCM (23,99 ml) a temperatura ambiente se añadió DMF-DMA (1,446 ml, 10,80 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La suspensión de color amarillo resultante se concentró a presión reducida para dar el producto de ciclación bruto en forma de un aceite de color amarillo. Una pequeña cantidad de material se trituró en  $\text{CH}_3\text{CN}$  para dar una muestra pura de 2-bromo-8-hidroxiimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxilato de etilo en forma de un sólido de color blanco. LCMS (Método B )  $m/z$  288,0 [M+1], Br-patrón; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8,39 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 4,27 (c,  $J=7,1$  Hz, 2H), 1,34 (t,  $J=7,0$  Hz, 3H).

El aceite de color amarillo se recogió en etanol (12,00 ml). Una solución acuosa, de hidróxido de potasio 7,0 N (3,60 ml, 25,2 mmol) se añadió gota a gota. La reacción se calentó a 90 °C durante 1 h. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la reacción se concentró para producir un aceite. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa acuosa se acidificó con HCl 1,0 N, formando un precipitado de color blanco. El sólido precipitado se recogió por filtración, se enjuagó con agua enfriada en hielo y se secó al vacío para proporcionar ácido 2-bromo-8-hidroxiimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxílico (0,610 g, 2,364 mmol, rendimiento del 65,7 % en 2 etapas). LCMS (Método B): 258,0 [M+1], Br patrón. HPLC (Método B): Tr 1,847 min (10-90 % ac CH<sub>3</sub>OH /0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4,0 min. gradiente con parada de 1 min. Columna: YMC COMBISCREEN® ODS-A. Caudal 4,0 ml/min, longitud de onda de detección 220 nm); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,26 (s, 1H), 8,01 (s, 1H).

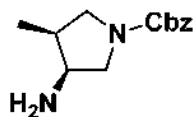
Etapas 6: 2-Bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (Intermedio 1)



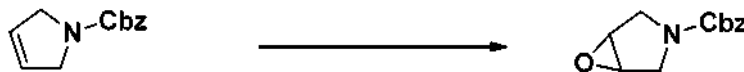
A un matraz de fondo redondo cargado con ácido 2-bromo-8-hidroxiimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxílico (55 g, 213 mmol) y POCl<sub>3</sub> (990 ml, 10,64 mol) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno se añadió DIPEA (37,2 ml, 213 mmol). La reacción se calentó a 120 °C durante 3 h. La solución transparente resultante se enfrió a temperatura ambiente y se concentró para eliminar el exceso de oxocloruro de fósforo. El residuo se disolvió en 100 ml de THF y se concentró. El proceso se repitió dos veces más para dar el 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxilato de metilo en bruto en forma de un sólido viscoso de color marrón. El sólido se recogió en 400 ml de THF y se enfrió a -40 °C. Una solución saturada de amoníaco en THF (200 ml) a -40 °C se añadió gota a gota. Después de completarse la adición, la reacción se agitó a -40 °C durante 15 minutos, el baño de refrigeración se retiró. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y se concentró a presión reducida. Se añadieron 700 ml de agua, y la suspensión se agitó durante 5 minutos y se filtró. La torta de filtro se lavó con 200 ml de agua y 200 ml de MTBE para proporcionar 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida en forma de un sólido de color amarillo pálido (41,2 g, 149 mmol, rendimiento del 70 %). LCMS (Método B): *m/z* 276,9, 278,9 [M+1]; HPLC (Método B): Tr 0,935 min (10-90 % ac CH<sub>3</sub>OH /0,2 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4,0 min. gradiente con parada de 1 min. Columna: YMC COMBISCREEN® ODS-A. Caudal 4,0 ml/min, longitud de onda de detección 220 nm); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,73 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,18 (s a, 1H), 8,06 (s a, 1H).

Intermedio 2

(3S,4S)-3-Amino-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo

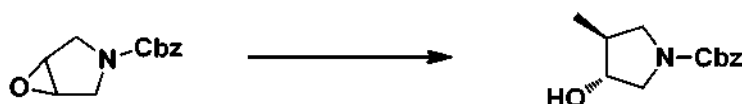


Etapas 1: 6-Oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxilato de bencilo



A un matraz de fondo redondo de 1 l provisto de barra magnética agitadora se añadió 2,5-dihidro-1H-pirrol-1-carboxilato de bencilo (25 g, 123 mmol) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (246 ml). La solución resultante se enfrió en un baño de hielo a 0 °C, momento en que se añadió mCPBA (42,5 g, 246 mmol) en tres porciones durante ~15 min. La suspensión resultante se calentó naturalmente a ta durante 2 días. LCMS indica reacción completa. La reacción se trató de la siguiente forma: la mezcla heterogénea se enfrió a -15 °C durante 1 hora, se filtró para retirar el sólido que se aclaró con DCM frío. El filtrado resultante se lavó con NaOH ac. 1 N (4 x 100 ml), agua (100 ml) y salmuera, después se secó con sulfato sódico anhidro. La fase DCM se concentró a 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxilato de bencilo (24,5 g, rendimiento del 91 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,31 - 7,44 (5 H, m), 5,08 - 5,21 (2 H, m), 3,90 (2 H, dd, *J*=19,70, 12,65 Hz), 3,65 - 3,77 (2 H, m), 3,42 (2 H, ddd, *J*=12,76, 6,16, 1,10 Hz); LCMS (CHROMOLITH® RP-18e 2,0x50 mm, 0,8 ml/min, Disolvente A: MeOH al 10 % en agua con TFA al 0,1 %, Disolvente B: MeOH al 90 % en agua con TFA al 0,1 %, gradiente con B al 0-100 % durante 4 minutos) tiempo de retención: 2,41 min; MS(ES+) *m/z*: 242,0 (M+Na<sup>+</sup>).

Etapas 2: (3R,4S)-3-Hidroxi-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo



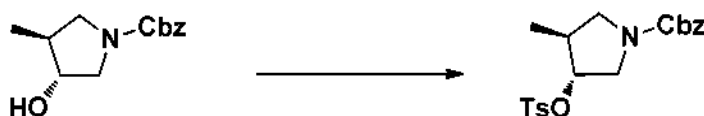
5 Bromuro de metilmagnesio 3 M en éter (99 ml, 296 mmol) se añadió gota a gota durante 1 hora a una suspensión de 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxilato de bencilo (26 g, 119 mmol) y complejo de dibromuro de cobre - sulfuro de dimetilo (24,38 g, 119 mmol) en THF anhidro (250 ml) a -40 °C en una atmósfera de nitrógeno. La reacción se dejó en agitación a esta temperatura durante 1 hora más antes de inactivar cuidadosamente la reacción usando 125 ml de cloruro de amonio sat. Después, la reacción se dejó calentar a ta y se diluyó con agua (125 ml), después se extrajo con acetato de etilo (3x150 ml). Las fases de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con salmuera, después se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la concentración, el material en bruto se purificó por

10 cromatografía ultrarrápida. Se obtuvo (+/-)-3-hidroxi-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (24,5 g, 104 mmol, rendimiento del 88 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,28 - 7,46 (5 H, m), 5,14 (2 H, s), 3,93 - 4,05 (1 H, m), 3,63 - 3,78 (2 H, m), 3,25 - 3,43 (1 H, m), 3,12 (1 H, ddd, J=13,26, 10. Este material se resolvió usando las siguientes condiciones de SFC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H 5 X 25cm, 5µm, Temp. columna 40 °C, Caudal: 290 ml/min, Fase móvil: CO<sub>2</sub>/MeOH=82/18, volumen de inyección: 2,5 ml (Conc. 118 mg/ml), longitud de onda del detector: 212 nm. Los isómeros aislados se denominaron "Pk1" y "Pk2" en

15 orden de elución. Las fracciones que contenían Pk2 se concentraron para proporcionar 10 g de (3R,4S)-3-hidroxi-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo en forma de un aceite de color amarillo. 84, 5,17 Hz), 2,06 - 2,26 (1 H, m), 1,90 (1 H, d, J=8,36 Hz), 1,03 (3 H, dd, J=6,71, 5,39 Hz); LCMS (CHROMOLITH® RP-18e 2,0x50 mm, 0,8 ml/min, Disolvente A: MeOH al 10 % en agua con TFA al 0,1 %, Disolvente B: MeOH al 90 % en agua con TFA al 0,1 %,

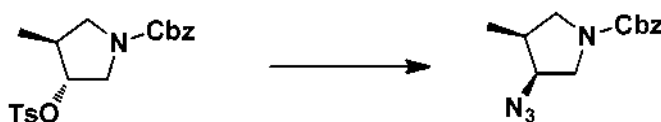
20 gradiente con B al 0-100 % durante 4 minutos) tiempo de retención: 2,56 min; MS(ES+) m/z: 236,0 (M+H<sup>+</sup>); Tiempo de retención del HPLC: 3,028 min (HPLC analítica Método H). Pureza quiral: 99,9 %ee (condiciones de HPLC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H (25 X 0,46cm, 5 µm), 30 % MeOH en CO<sub>2</sub>, 3 ml/min, 40 °C, 200-400 nm, 100 bares).

25 Etapa 3: (3S,4R)-3-metil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



30 (3R,4S)-3-hidroxi-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo(19,6 g, 83 mmol) se disolvió en piridina (83 ml). A la solución anterior, se añadió Ts-Cl (22,2 g, 117 mmol) en porciones a ta. Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se concentró al vacío para retirar piridina. El residuo se inactivó con agua enfriada con hielo (200 ml), se extrajo con acetato de etilo (3X150 ml). La fase combinada de acetato de etilo se lavó con agua, HCl 1 N, agua y NaHCO<sub>3</sub> sat., después se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la concentración, se obtuvo (3S,4R)-3-metil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (30 g, rendimiento del 92 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,76 - 7,83 (2 H, m), 7,30 - 7,40 (7 H, m), 5,11 (2 H, s), 4,57 - 4,64 (1 H, m), 3,56 - 3,73 (2 H, m), 3,38 - 3,54 (1 H, m), 3,08 - 3,19 (1 H, m), 2,33 - 2,55 (4 H, m), 0,97 (3 H, dd, J=14,86, 7,15 Hz); LCMS (CHROMOLITH® RP-18e 2,0x50 mm, 0,8 ml/min, Disolvente A: MeOH al 10 % en agua con TFA al 0,1 %, Disolvente B: MeOH al 90 % en agua con TFA al 0,1 %, gradiente con B al 0-100 % durante 4 minutos) tiempo de retención: 3,60 min; MS(ES+) m/z: 390 (M+H<sup>+</sup>).

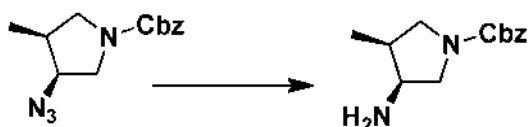
40 Etapa 4: (3S,4S)-3-azido-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo



45 (3S,4R)-3-metil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (20 g, 51,4 mmol) se disolvió en DMF (42.8 ml). Se añadió azida de sodio (5,68 g, 87 mmol) a ta y se calentó hasta 85 °C durante una noche. LCMS mostró conversión completa. La mezcla de reacción se enfrió a ta, se inactivó con agua enfriada con hielo, se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua, salmuera, después se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la concentración, se obtuvo (3S,4S)-3-azido-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (13 g, rendimiento del 97 %) en forma de un aceite amarillento y se usó directamente en la siguiente reducción. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,29 - 7,44 (5 H, m), 5,08 - 5,22 (2 H, m), 3,94 - 4,04 (1 H, m), 3,52 - 3,76 (3 H, m), 3,00 - 3,15 (1 H, m), 2,29 - 2,48 (1 H, m), 1,13 (3 H, t, J=7,04 Hz); LCMS (CHROMOLITH® RP-18e 2,0x50 mm, 0,8 ml/min, Disolvente A: MeOH al 10 % en agua con TFA al 0,1 %, Disolvente B: MeOH al 90 % en agua con TFA al 0,1 %, gradiente con B al 0-100 % durante 4 minutos) tiempo de retención: 3,41 min; MS(ES+) m/z: 261,0 (M+H<sup>+</sup>).

55 Etapa 5: (3S,4S)-3-amino-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (Intermedio 2)

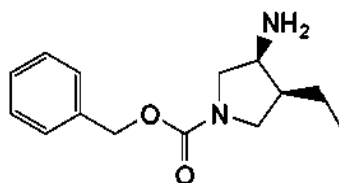




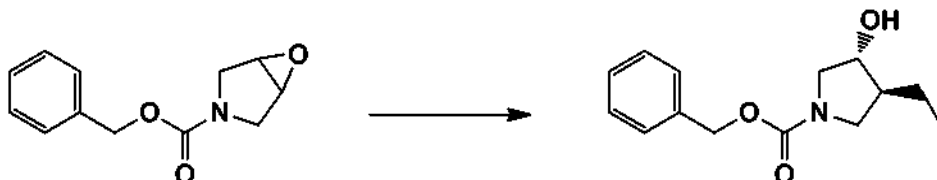
Se añadió trifetilfosfina (11,96 g, 45,6 mmol) a una solución en agitación de acetonitrilo (164 ml) y agua (16,44 ml) de 3-azido-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (11,3 g, 43,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 60 °C durante una noche. La mezcla de reacción se concentró. El residuo resultante se diluyó con 50 ml de hielo-agua, se trató con HCl 1 N (47,8 ml, 47,8 mmol). La solución acuosa ácida (pH 1) se extrajo con EtOAc (4 x 100 ml) para retirar subproductos/impurezas de Ph<sub>3</sub>P y Ph<sub>3</sub>PO. La parte acuosa ácida que contenía el producto se enfrió en un baño de hielo, se neutralizó con NaOH 1 N (52,1 ml, 52,1 mmol). La mezcla turbia resultante se extrajo a continuación con DCM (3x 150 ml). Las fases de DCM combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico anhidro. Después de la concentración, se obtuvo (3S,4S)-3-amino-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (9,8 g, rendimiento del 96 %) en forma de un aceite de color amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,31 - 7,47 (5 H, m), 5,09 - 5,23 (2 H, m), 3,42 - 3,69 (3 H, m), 3,12 - 3,38 (2 H, m), 2,17 - 2,36 (1 H, m), 1,31 (2 H, a), 1,06 (3 H, dd, J=6,82, 3,30 Hz); LCMS (CHROMOLITH® RP-18e 2,0x50 mm, 0,8 ml/min, Disolvente A: MeOH al 10 % en agua con TFA al 0,1 %, Disolvente B: MeOH al 90 % en agua con TFA al 0,1 %, gradiente con B al 0-100 % durante 4 minutos) tiempo de retención: 1,97 min; MS(ES+) m/z: 235,1 (M+H<sup>+</sup>).

## Intermedio 3

(3S,4S)-3-amino-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo

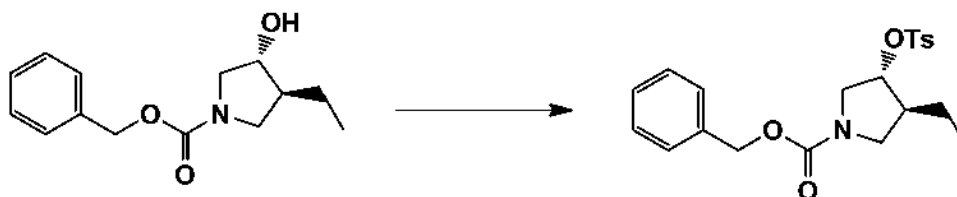


Etapa 1: (3S,4R)-3-Etil-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo



Una mezcla de 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxilato de bencilo (4 g, 18,25 mmol) y bromo(dimetilsulfuro) de cobre(I) (3,75 g, 18,25 mmol) en tetrahidrofurano (40 ml) se enfrió a -30 °C. Una solución 3 M de bromuro de etilmagnesio (15,20 ml, 45,6 mmol) en Et<sub>2</sub>O se añadió gota a gota a la mezcla de reacción durante 35 minutos, manteniendo la temperatura interna a o por debajo de -30 °C. Tras completarse la adición, la mezcla de reacción resultante se dejó calentar a -15 °C durante 45 minutos. En este momento, la reacción se comprobó mediante HPLC. La mezcla de reacción se dejó calentar gradualmente a ta y la HPLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (50 ml). La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se inactivó mediante la adición lenta de cloruro de amonio ac. sat. (~10 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con H<sub>2</sub>O (20 ml). La capa orgánica se concentró y el producto bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice para dar (3S,4R)-3-etil-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo (17,25 g, 69,2 mmol, rendimiento del 69,0 %). LCMS: (M+23)= 242, t=1,87 min.

Etapa 2: (3S,4R)-3-Etil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

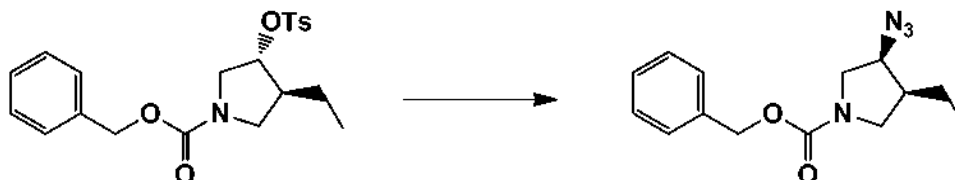


(3S,4R)-3-Etil-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo (18,9 g, 76 mmol), cloruro de 4-metilbenceno-1-sulfonilo (21,68 g, 114 mmol) se disolvieron en DCM (100 ml) y se enfriaron en un baño de hielo. Se añadieron *N,N*-

dimetilpiridin-4-amina (1,852 g, 15,16 mmol) y trietilamina (11,51 g, 114 mmol) y la mezcla de reacción se dejó calentar a TA durante una noche. La suspensión se pasó por una columna de gel de sílice y se eluyó con heptanos/EA (mezclas 9:1 a 4:1) para dar (3S,4R)-3-etil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (28,7 g, 71,1 mmol, rendimiento del 94 %). LCMS: M+1= 404, t=3,07 min.

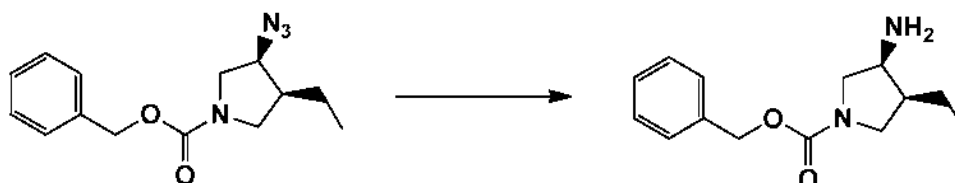
5

Etapa 3: (3R,4S)-3-Azido-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo



- 10 (3S,4R)-3-Etil-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (21,25 g, 52,7 mmol) en DMF (50 ml) se añadió a una solución de azida sódica (8,56 g, 132 mmol) en DMF (50 ml) y agua (30 ml) y se calentó a una temp. del baño de 100 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo/agua y se agitó. La capa orgánica se lavó con agua, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. para dar (3S,4S)-3-azido-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (14,5 g, 52,9 mmol, rendimiento del 100 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,34-7,41 (5 H, m), 5,13-5,21 (2 H, m), 4,08-4,11 (1 H, m), LCMS:M+23=299, t=2,15 min.
- 15

Etapa 4: (3S,4S)-3-Amino-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (Intermedio 3)



20

(3S,4S)-3-Azido-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (14,0 g, 51,0 mmol) se disolvió en acetonitrilo (200 ml). Se añadió agua (20 ml) y se agitó a TA hasta conseguir una solución transparente. Esta soln. se calentó a 60 °C durante 6,5 h. Acetonitrilo se retiró al vacío y la porción acuosa residual se diluyó con HCl 1 N (100 ml) que se lavó con acetato de etilo (5 x 50 ml) hasta que todo el Ph<sub>3</sub>P y óxido de Ph<sub>3</sub>P se retiró de la porción acuosa. La porción acuosa que contiene la sal de HCl de la amina se enfrió a ~5 grados. Esta soln ácida se basificó (pH 12) con NaOH 1 N. Esta suspensión básica lechosa se extrajo con DCM (5x, 50 ml), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El vacío durante una noche proporcionó (3S,4S)-3-amino-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (11,01 g, 44,3 mmol, rendimiento del 87 %). LCMS:M+1=249, t=1,39 min. Este material se resolvió usando las siguientes condiciones de SFC quiral [columna: CHIRALPAK® AD-H 5 X 25cm, 5µm, Temp. columna 48 °C, Caudal: 290 ml/min, Fase móvil: CO<sub>2</sub>/MeOH=77/23 con trietilamina al 0,3 %, volumen de inyección: 3 ml (Conc. 68,8 mg/ml), longitud de onda del detector: 215 nm, 100 bares]. Los isómeros aislados se denominaron "Pk1" y "Pk2" en orden de elución. Las fracciones que contenían Pk1 se concentraron para proporcionar 5,1 g del (3S,4S)-3-amino-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo deseado (Intermedio 9). Pureza quiral: > 99 %ee (condiciones de HPLC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H (25 X 0,46cm, 5 µm), 30 % MeOH en CO<sub>2</sub> con trietilamina al 0,3 %, 3ml/min, 40 °C, 200-400 nm, 100 bares). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ ppm 7,33-7,42 (5 H, m), 5,12-5,17 (2 H, m), 3,51-3,67 (3 H, m), 3,32-3,40 (1H, m), 3,14-3,21 (1 H, m), 2,0-2,15 (1 H, m), 1,44-1,55 (2 H, m), 0,97-1,02 (5 H, m). LCMS: (M+1)=249, t=1,39 min.

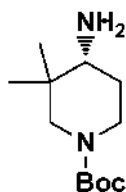
30

35

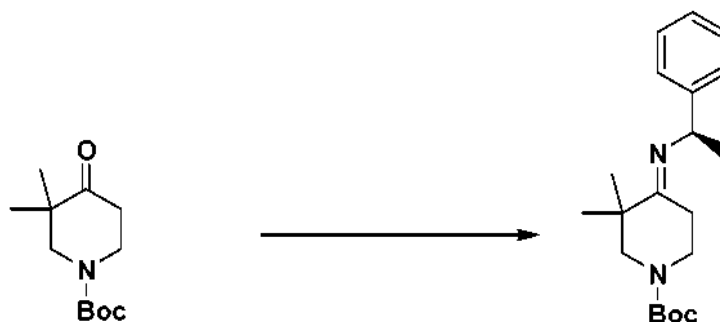
Intermedio 4

40

(R)-4-amino-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo

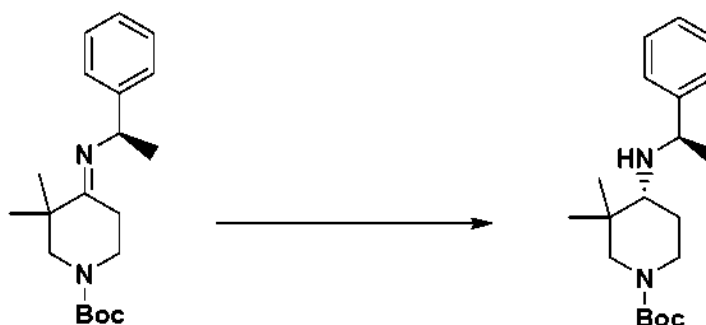


45 Etapa 1: (R,E)-3,3-Dimetil-4-(1-feniletilimino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo



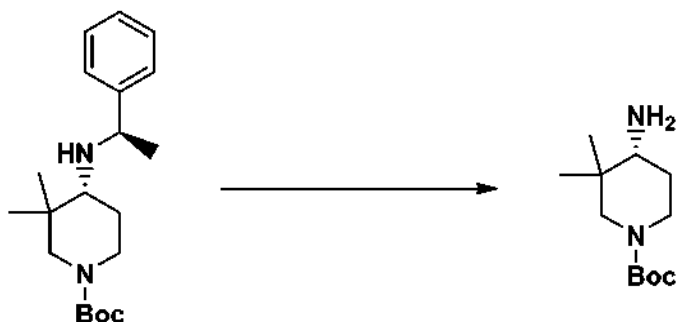
Una solución de (R)-1-feniletanamina (2,56 g, 21,12 mmol) y trietilamina (14,7 ml, 106 mmol) en diclorometano (40 ml) se enfrió en un baño de hielo y se añadió tetracloruro de titanio (8,80 ml, 8,80 mmol) gota a gota dando una mezcla de color marrón claro. El baño de enfriamiento se retiró y se añadió 3,3-dimetil-4-oxopiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (4,00 g, 17,60 mmol) en forma sólida en una porción y la mezcla resultante se dejó en agitación a ta durante una noche. A la mezcla resultante se añadieron 75 ml de éter dietílico y la mezcla se agitó a ta durante 15 min después se filtró a través de una capa de CELITE® para retirar el sólido y la torta de filtro se aclaró con más éter (30 ml x 2). El filtrado resultante de color amarillo transparente se concentró en un evaporador rotatorio para proporcionar un líquido de color amarillo como el compuesto del título (5,80 g, 17,6 mmol, cuantitativo). Este material se usó directamente sin purificación adicional.

Etapa 2: (R)-3,3-Dimetil-4-((R)-1-feniletilamino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo



Se disolvió (R,E)-3,3-dimetil-4-(1-feniletilimino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (5,80 g, 17,55 mmol) en etanol (50 ml) y se enfrió a -78 °C después se añadió borohidruro sódico (0,332 g, 8,78 mmol) y la mezcla resultante se dejó en agitación a -78 °C durante 2 h. Después, la mezcla se enfrió, se añadió HCl (10 ml) ac. 2 N gota a gota lentamente y la mezcla resultante se dejó en agitación vigorosamente durante 30 min. La mezcla se enfrió y se basificó mediante la adición de carbonato sódico ac al 10 % y después se concentró para retirar la mayor parte del etanol. La porción acuosa resultante se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml) y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato sódico anhid., se decantaron y se concentraron al vacío para proporcionar un líquido de color amarillo como el producto en bruto. Este material se purificó mediante cromatografía ISCO preparativa (hex/EtOAc; columna de gel de sílice de 120 g) y las fracciones que contenían el producto mayoritario se concentraron para proporcionar el compuesto del título como un aceite casi incoloro (3,0 g, 9,0 mmol, 51 %). HPLC (Método B) tiempo de retención = 2,25 min. LCMS (m+1) = 333,2. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD): δ ppm 7,31 - 7,42 (4 H, m), 7,22 - 7,29 (1 H, m), 3,88 - 3,98 (1 H, m), 3,83 (1 H, c, J=6,66 Hz), 3,63 - 3,72 (1 H, m), 2,49 - 2,85 (2 H, m), 2,34 (1 H, dd, J=10,82, 4,16 Hz), 1,47 (9 H, s), 1,36 (3 H, d, J=6,66 Hz), 1,22 - 1,33 (2 H, m), 1,05 (3 H, s), 0,90 (3 H, s). Se cree que las fracciones que contenían el producto minoritario era el diastereómero minoritario por lo que también se concentraron para proporcionar un aceite transparente. HPLC (Método B) tiempo de retención = 2,50 min. LCMS (m+1) = 333,2.

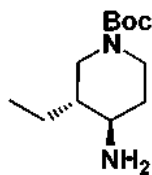
Etapa 3: (R)-4-amino-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (Intermedio 4)



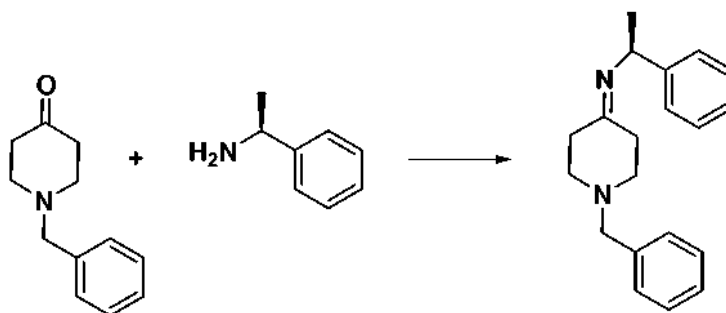
5 Un frasco presurizado se cargó con paladio sobre carbono (0,192 g, 0,180 mmol) y (R)-3,3-dimetil-4-((R)-1-feniletilamino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (3,00 g, 9,02 mmol) en etanol (60 ml) y la mezcla resultante se agitó bajo 50 psi de hidrógeno en un aparato Parr. Después de 5 h, el catalizador se retiró por filtración, se enjuagó con metanol, y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite transparente (2,0 g, 8,76 mmol, 97 %). El material no se purificó adicionalmente y se usó directamente en la siguiente transformación. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 4,07 (d, *J*=13,0 Hz, 1H), 3,78 - 3,62 (m, 1H), 3,01 - 2,62 (m, 2H), 2,56 (dd, *J*=11,1, 4,2 Hz, 1H), 1,74 - 1,63 (m, 1H), 1,51 (s, 9H), 1,49 - 1,43 (m, 1H), 1,00 (s, 3H), 0,88 (s, 3H).

Intermedio 5

15 (3R,4R)-4-amino-3-etilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo

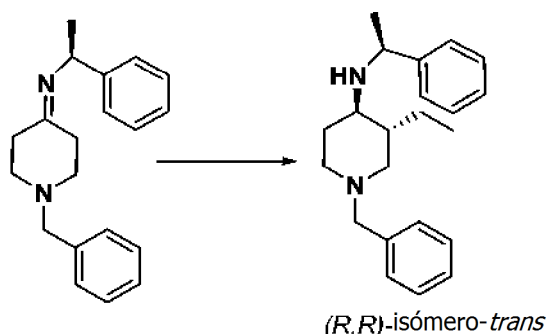


Etapa 1: Bencilpiperidin-4-ilideno)-1-feniletanamina



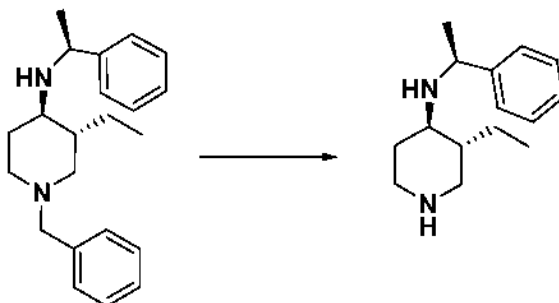
20 A una solución de (S)-1-feniletanamina (1,921 g, 15,85 mmol) en benceno (8,81 ml) se añadieron tamices moleculares en agua y 1-bencilpiperidin-4-ona (2,50 g, 13,21 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla del producto se filtró y se concentró a presión reducida para dar un aceite de color amarillo, que se dejó reposar al vacío a 45 °C durante 14 h para retirar el reactivo residual, dando (S)-N-(1-bencilpiperidin-4-ilideno)-1-feniletanamina (3,24 g, 11,08 mmol, rendimiento del 84,0 %) en forma de un aceite de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 7,33 - 7,25 (m, 10H), 4,81 - 4,76 (m, 1H), 3,54 (s, 2H), 2,72 - 2,33 (m, 8H), 1,47 (d, *J*=6,6 Hz, 3H). LCMS (Método E) *m/z* 291,3 ([M+H]<sup>+</sup>).

30 Etapa 2: (3R,4R)-1-Bencil-3-etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina



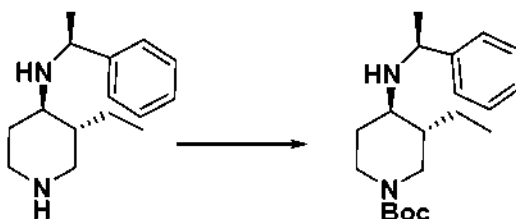
A una solución de LDA (7,20 ml, 14,40 mmol) en THF (22,16 ml) enfriada a -10 °C se añadió una solución (5 ml) de (S)-N-(1-bencilpiperidin-4-ilideno)-1-feniletanamina (3,24 g, 11,08 mmol) en THF. La reacción se agitó durante 30 minutos. Se añadió yoduro de etilo (1,164 ml, 14,40 mmol), y la agitación continuó durante 1 h. La solución de reacción se enfrió a -78 °C. Se añadieron etanol (22,16 ml) y borohidruro sódico (0,545 g, 14,40 mmol). La agitación se continuó durante 15 minutos. El matraz de reacción se transfirió a un baño a -10 °C y la agitación se continuó durante 1 h. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente, se concentró hasta la mitad de su volumen y se inactivó mediante la adición gota a gota de HCl 6,0 N hasta que cesó el desprendimiento de gases. La solución se diluyó con agua (10 ml), se ajustó a pH 12 con NaOH 6,0 N, y se extrajo con acetato de etilo (3x, 100 ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se concentraron para dar un aceite de color amarillo. La mezcla del producto en bruto se purificó mediante cromatografía con medio presurizado (columna de gel de sílice, eluyente EtOAc/hexanos, elución en gradiente 40-100 %). La fracción de EtOAc al 40 % en hexanos proporcionó dos isómeros *cis*, el isómero de elución rápida (499,3 mg, rendimiento del 14,0 %) y el isómero de elución lenta (319,1 mg, rendimiento del 8,9 %). La fracción con el 100 % de EtOAc proporcionó un único isómero *trans*, (3R,4R)-1-bencil-3-etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina (679,2 mg, 2,106 mmol, rendimiento del 19,0 %) en forma de un aceite incoloro. LCMS (Método E)  $m/z$  323,4 ( $[M+H]^+$ ).

Etapa 3: (3R,4R)-3-Etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina



A una solución de (3R,4R)-1-bencil-3-etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina (679,2 mg, 2,106 mmol) en 1,2-dicloroetano (3,50 ml) a 0 °C se añadió cloroformiato de 1-cloroetilo (0,276 ml, 2,53 mmol) gota a gota. Después de agitar durante 20 minutos, el baño de hielo se retiró, se retiró y la reacción se calentó a reflujo durante 1 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a presión reducida. Se añadió metanol (10,5 ml), y la reacción se calentó a reflujo durante 2 h. Después de la retirada del disolvente, el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato sódico, se filtró, y se concentró a presión reducida, dando (3R,4R)-3-etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina (443 mg, 1,906 mmol, rendimiento del 91,0 %) en forma de un aceite de color amarillo. LCMS (Método E)  $m/z$  233,3 ( $[M+H]^+$ ).

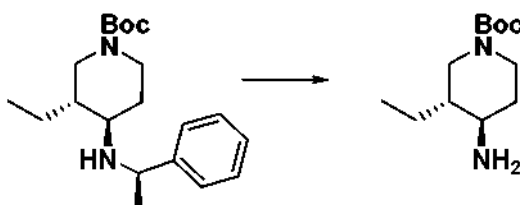
Etapa 4: (3R,4R)-3-etil-4-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1-carboxilato de *terc*-butilo



A una solución de (3R,4R)-3-etil-N-((S)-1-feniletil)piperidin-4-amina (443 mg, 1,906 mmol) en diclorometano (6.4 ml)

se añadieron diisopropiletilamina (832  $\mu$ l, 4,77 mmol) y dicarbonato de *tert*-butilo (664  $\mu$ l, 2,86 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la retirada del disolvente, el residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía con medio presurizado (columna de gel de sílice, eluyente EtOAc/hexanos, elución en gradiente 0-100 %) para producir (3R,4R)-3-etil-4-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (430,5 mg, 1,295 mmol, rendimiento del 67,9 %) en forma de un sólido de color blanco. LCMS (Método E)  $m/z$  333,3 ( $[M+H]^+$ ).

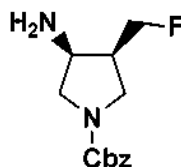
Etapa 5: (3R,4R)-4-amino-3-etilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (Intermedio 5)



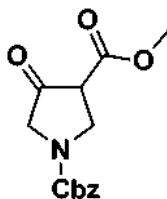
Un matraz se purgó abundantemente con nitrógeno y se cargó con hidróxido de paladio al 20 % sobre carbono (91 mg, 0,647 mmol). Se añadió una solución de (3R,4R)-3-etil-4-(((R)-1-feniletil)amino)piperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (430,5 mg, 1,295 mmol) en ácido acético (8,6 ml). El matraz se lavó abundantemente con nitrógeno, se precintó, se purgó un corto periodo de tiempo, y se cargó con hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 14 h. El matraz se evacuó, se volvió a llenar con nitrógeno, y se abrió. La mezcla de reacción se filtró a través de CELITE®. El filtrado se concentró mediante destilación azeotrópica con tolueno (3x 25 ml) a presión reducida para retirar el ácido acético residual, dando (3R,4R)-4-amino-3-etilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo, sal de HOAc (351 mg, 1,217 mmol, rendimiento del 94,0 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN  $^1H$  (400MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  4,16 (d,  $J=11,2$  Hz, 1H), 4,07 (d,  $J = 13,9$  Hz, 1H), 3,03 - 2,85 (m, 2H), 2,56 (s a, 1H), 2,02 - 1,94 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,77 - 1,66 (m, 1H), 1,53 - 1,36 (m, 10H), 1,32 - 1,16 (m, 1H), 1,00 (t,  $J=7,5$  Hz, 3H).

Intermedio 6

(3S,4S)-3-Amino-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

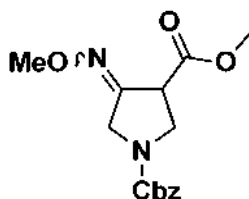


Etapa 1: 1-3-Metil 4-oxopirrolidina-1,3-dicarboxilato de bencilo



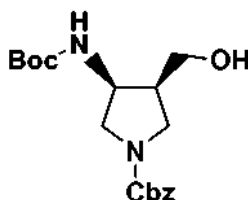
Una solución de carbobenciloxiglicina metil éster (10 g, 44,8 mmol) y metil acrilato (4,03 ml, 44,8 mmol) en tolueno (100 ml) a 0  $^{\circ}C$  se añadió NaH al 60 % en aceite mineral (1,971 g, 49,3 mmol) que se agitó durante 10 minutos, y a continuación se calentó hasta TA y se agitó durante 20 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 50  $^{\circ}C$  durante 3 h. La mezcla de reacción se inactivó con ácido cítrico al 10 % hasta un pH de aproximadamente 3, y después se extrajo con 100 ml x 3 de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 100 ml de salmuera y se secaron con  $Na_2SO_4$ . Filtración y concentración para producir el producto (12 g, rendimiento del 96 %). MS(ES+)  $m/z$ : 278,2 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 2,44 min (HPLC analítica Método B).

Etapa 2: 1-3-metil 4-(metoxiimino)pirrolidina-1,3-dicarboxilato de bencilo



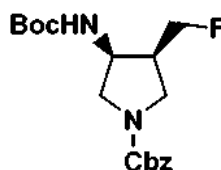
Una solución de 1-3-metil 4-oxopirrolidina-1,3-dicarboxilato de bencilo (12 g, 43,2 mmol) en piridina (50 ml) a 0 °C se añadió clorhidrato de O-metilhidroxilamina (5,51 g, 66,0 mmol) que se agitó durante 10 minutos, y después se calentó hasta TA y se agitó durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró para producir un producto en bruto que se repartió en 300 ml de HCl 1 N y 300 ml de EtOAc. La capa orgánica se lavó con 100 ml de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extrajeron con 200 ml de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Filtración y concentración para producir el producto (12,6 g, rendimiento del 95 %).

10 Etapa 3: (+/-)-Cis-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



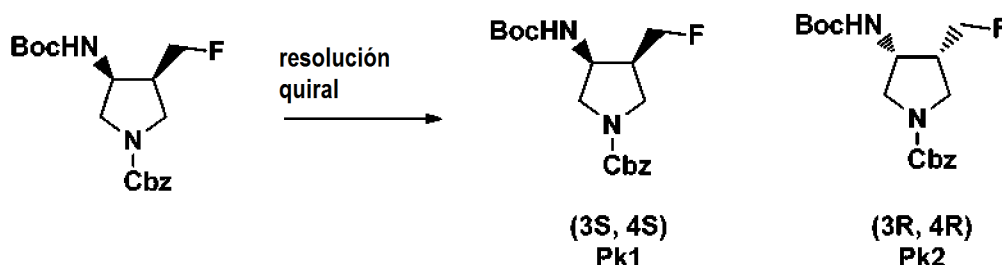
15 Una solución de 1-3-metil 4-(metoxiimino)pirrolidina-1,3-dicarboxilato de bencilo (12,6 g, 41,1 mmol) en THF (100 ml) a -78 °C se añadió complejo de borano-THF (1 M en THF, 148 ml, 148 mmol) gota a gota y se agitó durante 1,5 h, y después se calentó a 0 °C y se agitó durante 2 h y se calentó adicionalmente a TA y se agitó durante 16 h. La reacción se interrumpió con agua a 0 °C hasta cese de efervescencia, y a lo anterior se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,68 g, 41,1 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta TA y se agitó durante 1 h. Se añadió (BOC)<sub>2</sub>O (11,46 ml, 49,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 16 h. La mezcla de reacción recibió 200 ml de agua y 500 ml de EtOAc y se agitó durante 10 minutos. La fase orgánica se separó y se lavó con 200 ml de salmuera, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y después se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 0-70 % acetato de etilo en hexanos, para dar el compuesto del título racémico (5,46 g, rendimiento del 38 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ 7,41 - 7,30 (m, 5H), 5,15 (d, J=1,3 Hz, 2H), 4,86 - 4,72 (m, 1H), 4,30 (s a, 1H), 3,94 - 3,85 (m, 1H), 3,66 (dd, J=11,9, 5,1 Hz, 2H), 3,59 - 3,44 (m, 3H), 2,96 (c, J=11,4 Hz, 1H), 2,57 (s a, 1H), 1,50 - 1,44 (m, 9H). MS(ES+) m/z: 351,1 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 2,79 min (HPLC analítica Método B).

Etapa 4: (+/-)-Cis-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



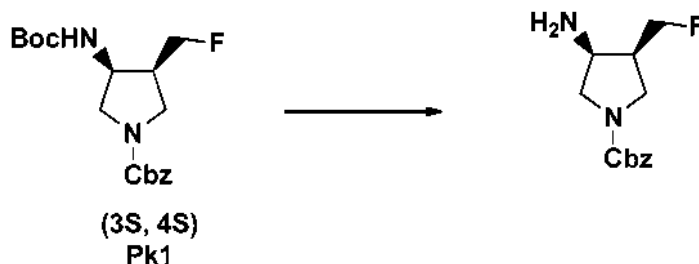
30 A una solución de (+/-)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(hidroximetil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (4,70 g, 13,41 mmol) y Et<sub>3</sub>N (2,52 ml, 18,11 mmol) en diclorometano (100 ml) se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,254 ml, 16,10 mmol) gota a gota a 0 °C y la mezcla resultante se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y después se lavó con 50 ml de solución de ácido cítrico al 10 %, 50 ml de salmuera y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La filtración y concentración proporcionaron el intermedio de mesilato en bruto que se usó directamente en la siguiente transformación sin purificación adicional. MS(ES+) m/z: 429,1 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 2,836 min (HPLC analítica Método H). A una solución de (+/-)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(((metilsulfonil)oxi)metil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (5,75 g, 13,41 mmol) en THF (50 ml) se añadió TBAF (1 M en THF, 30,8 ml, 30,8 mmol) a 0 °C seguido de calentamiento a ta y la agitación durante 16 h. Después, la mezcla de reacción se calentó a 55 °C durante 5 h antes de enfriar y concentrar para producir el compuesto intermedio de flúor en bruto. A este material se añadieron 150 ml de agua y la mezcla resultante se extrajo con 200 ml x 2 de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 200 ml de salmuera y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron, se concentraron y se purificaron por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con 0-50 % acetato de etilo en hexanos, para dar el compuesto del título (2,307 g, rendimiento del 49 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, cloroformo-d) δ 7,42 - 7,31 (m, 5H), 5,16 (d, J=2,6 Hz, 2H), 4,85 - 4,67 (m, 1H), 4,66 - 4,55 (m, 1H), 4,54 - 4,32 (m, 1H), 3,79 - 3,64 (m, 2H), 3,49 - 3,28 (m, 2H), 2,79 - 2,56 (m, 1H), 1,47 (s, 9H). MS(ES+) m/z: 353,1 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 3,008 min (HPLC analítica Método B).

Etapa 5: (3S,4S)-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo y (3R, 4R)-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



5 El (+/-)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (2,307 g, 6,55 mmol) se separó con las siguientes condiciones de SFC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H 25 X 3cm, 5µm, Temp. columna 45 °C, Caudal: 150ml/min, Fase móvil: CO<sub>2</sub>/MeOH=65/35, volumen de inyección: 1,5ml (Conc. 50mg/ml), longitud de onda de detección: 220 nm. Los isómeros aislados se denominaron "Pk1" y "Pk2" en orden de elución. El Pk1 se  
10 recogió como el producto (3S,4S)-enantiomérico deseado (1,012 g, rendimiento del 44 %). RMN <sup>1</sup>H (500MHz, cloroformo-d) δ 7,43 - 7,31 (m, 5H), 5,16 (d, J=4,2 Hz, 2H), 4,87 - 4,66 (m, 1H), 4,65 - 4,34 (m, 2H), 3,80 - 3,66 (m, 2H), 3,48 - 3,27 (m, 2H), 2,77 - 2,60 (m, 1H), 1,47 (s, 9H). MS(ES+) m/z: 353,1 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 3,028 min (HPLC analítica Método B). Pureza quiral: 99,9 %ee (condiciones de HPLC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H (25 X 0,46cm, 5 µm), 35 % MeOH en CO<sub>2</sub>, 3 ml/min, 45 °C, 220 nm, 100 bar).

15 Etapa 6: (3S,4S)-3-amino-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (Intermedio 6)

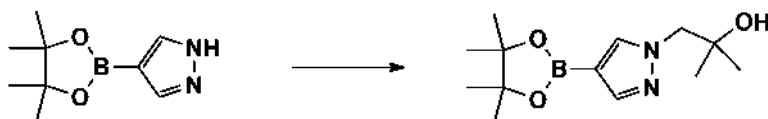


20 Una solución de (3S,4S)-3-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (Pk1) (1,012 g, 2,87 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) a 0 °C se añadió TFA (2,212 ml, 28,7 mmol) y la mezcla resultante se dejó calentar a ta y en agitación durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y se redisolvió en 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con 20 ml de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M y 20 ml de salmuera después se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La filtración y la concentración dio como resultado el compuesto del título (0,718 g, rendimiento del 99 %). RMN <sup>1</sup>H (500MHz, cloroformo-d) δ 7,41 - 7,31 (m, 5H), 5,24 - 5,08 (m, 2H), 4,77 - 4,43 (m, 2H), 3,75 - 3,57 (m, 3H), 3,37 (s, 2H), 2,66 - 2,49 (m, 1H). MS(ES+) m/z: 253,2 (M+H); Tiempo de retención del HPLC: 1,023 min (HPLC analítica Método B). Pureza quiral: 99,9 %ee (condiciones de HPLC quiral: columna: CHIRALPAK® AD-H (25 X 0,46cm, 5 µm), 35 % MeOH en CO<sub>2</sub>, 3 ml/min, 45 °C, 220 nm, 100 bar).

30 Intermedios 7-12

Intermedio 7

35 2-Metil-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il) propan-2-ol



40 Una suspensión de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (514.3 mg, 2,65 mmol), carbonato de cesio (1,295 g, 3,98 mmol) y 2,2-dimetiloxirano (0,589 ml, 6,63 mmol) en acetonitrilo (5 ml) se calentó a 130 °C con irradiación de microondas durante 1 h. La mezcla resultante se concentró. El residuo se trituró con diclorometano y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se filtró. El filtrado se concentró para dar 2-metil-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (0,4289 g). Este material se usó en las siguientes reacciones de acoplamiento de Suzuki sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,84 (d, J=0,4 Hz, 1H), 7,55 (d, J=0,7 Hz, 1H), 4,02 (s, 2H), 4,01 (s, 1H), 1,25 (s, 12H), 1,04 (s, 6H).

45



## Intermedios 8-12

De acuerdo con el procedimiento para la preparación del Intermedio 7, los Intermedios 8-12 se prepararon por reacción de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol con (R)-2-metiloxirano, (S)-2-metiloxirano, (S)-(+)-3,3,3-trifluoro-1,2-epoxipropano (R)-(+)-3,3,3-trifluoro-1,2-epoxipropano y (R)-2-(metoximetil)oxirano, que estaban comercialmente disponibles.

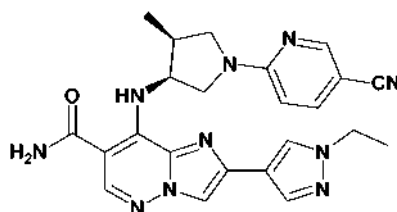
Los intermedios 8-10 se analizaron usando HPLC analítica Método B y LCMS Método B. Los intermedios 11 y 12 se analizaron usando HPLC analítica Método B y LCMS Método A.

Intermedio N.º	Estructura química	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
8		2,033	253,2
9		2,032	253,2
10		2,090	307,2
11		3,393	307,08
12		3,063	283,08

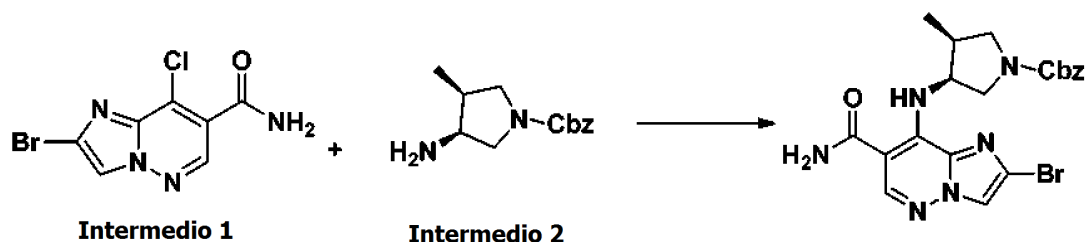
## Ejemplos

## Ejemplo 1

8-(((3S,4S)-1-(5-Cianopiridin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



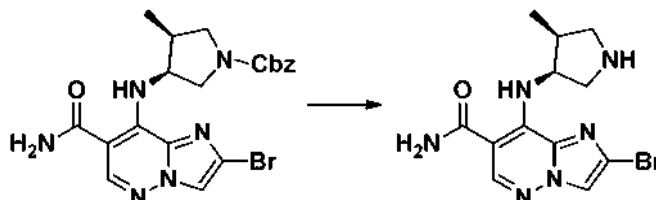
Etapas 1 (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazina-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo



Una solución de 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (2,198 g, 7,98 mmol), (3S,4S)-3-Amino-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (2,15 g, 9,18 mmol) y base de Hunig (4,18 ml 23,94 mmol) en DMF (7,9 ml)

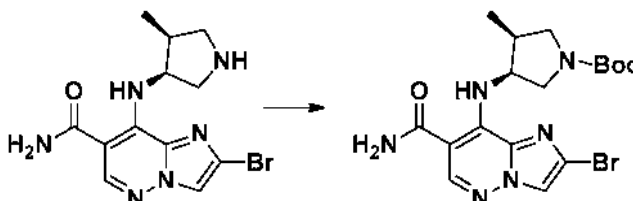
en un vial de reacción se agitó a 90 °C durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución de reacción se añadió lentamente a una mezcla de hielo-agua en agitación dando como resultado un precipitado color castaño claro. La suspensión se agitó durante 30 min. Se recogió (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (3,78 g, 7,98 mmol, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color castaño claro por filtración. ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  473, 475 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 3,808 min.

Etapa 2: 2-Bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



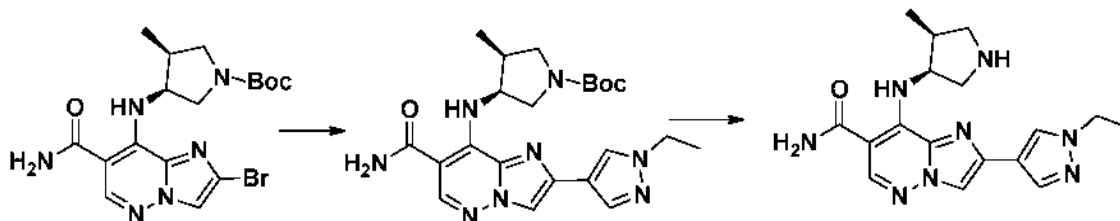
A una suspensión de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (3,78 g, 7,98 mmol) en acetonitrilo (53 ml) a 0 °C se añadió yodotrimetilsilano (3,26 ml, 23,96 mmol) gota a gota. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con metanol (3,23 ml, 80 mmol). La suspensión resultante se agitó a 0 °C durante 30 min, se filtró, se lavó con éter dietílico, y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, 2 bromhidrato (3,94 g, 7,86 mmol, rendimiento del 98 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI-MS (LCMS analítica Método B):  $m/z$  341,1 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 1,503 min.

Etapa 3: (3S,4S)-3-((2-Bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo



A una suspensión de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (1,206 g, 2,548 mmol) en DCM (12 ml) se añadió base de Hunig (2,270 ml, 13,00 mmol) seguido de la adición lenta de una solución de BOC<sub>2</sub>O (0,905 ml, 3,90 mmol) en DCM (6 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se repartió entre agua y DCM. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar un sólido de color castaño. La mezcla en bruto se trituró en CH<sub>3</sub>CN para recoger el producto en forma de un sólido de color blanquecino (528,5 mg) por filtración. El filtrado se concentró y se purificó en una columna ultrarrápida (columna ISCO 12 g, 20-70 % EtOAc/hex durante 15 min) para proporcionar más producto (324,4 mg) en forma de un sólido de color blanco. El peso combinado del (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo fue 852,9 mg (1,941 mmol, rendimiento del 76,2 %). ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  441 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 3,771 min.

Etapa 4: 2-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

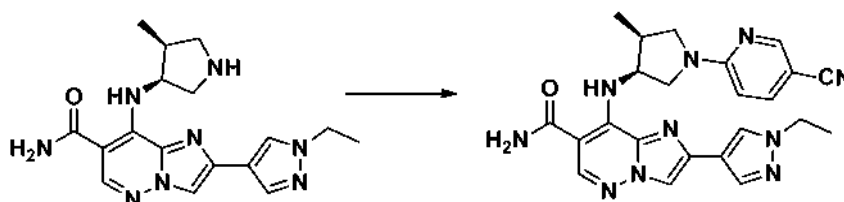


Una solución de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (200 mg, 0,455 mmol), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (202 mg, 0,911 mmol) y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ac 2 M (0,683 ml, 1,366 mmol) en dioxano (2 ml) en un vial de reacción se purgó con N<sub>2</sub> durante 2 min, seguido de la adición de aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) (37,5 mg, 0,046 mmol). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 1 min, se precipitó y se calentó a 100 °C durante 120 min. La mezcla del producto se repartió

entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con salmuera, se filtró a través de CELITE®, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (ISCO 12 g, 20-80 % EtOAc/hexano durante 15 min) para proporcionar (3S,4S)-3-((7-carbamoil-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilatode *tert*-butilo en forma de un sólido de color blanquecino, 139 mg. ESI-MS (Método A): *m/z* 455,2 ([M+H]<sup>+</sup>).

El sólido de color crema en DCM (3 ml) se trató con TFA (0,351 ml, 4,55 mmol) a temperatura ambiente durante 2 h y, después de eliminar el disolvente, para dar como resultado 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (170 mg, 0,363 mmol, rendimiento del 80 %) en forma de un sólido de color blanquecino. ESI-MS (Método A): *m/z* 355,1 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método A) Tr: 2,100 min.

Etapa 5: 8-(((3S,4S)-1-(5-Cianopiridin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

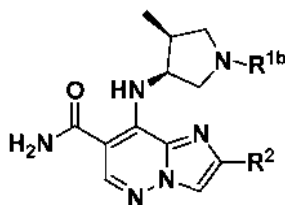


Una solución de 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, 2 TFA (0,020 g, 0,034 mmol), 6-bromonicotinonitrilo (0,013 g, 0,069 mmol) y base de Hunig (0,030 ml, 0,172 mmol) en DMF (0,3 ml) en un vial de reacción se agitó a 100 °C durante 5 h. El material en bruto se purificó a través de LC/MS preparativa (Método A). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación por centrifugación para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 1 (10,0 mg, 0,022 mmol, rendimiento del 63,8 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, metanol : cloroformo deuterado 1:1) δ 8,53 (s a, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,84 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 6,69 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 6,32 (s a, 1H), 4,43 (c, *J* = 7,3 Hz, 3H), 4,19 (s a, 1H), 4,12 - 3,91 (m, 2H), 3,70 - 3,57 (m, 1H), 3,06 (d, *J* = 12,9 Hz, 1H), 1,72 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 1,43 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H). LC/MS (Método F): *m/z* 456,20 ([M+H]<sup>+</sup>), Tr. 1,310 min.

## Ejemplos 2-10

De acuerdo con el procedimiento descrito para el Ejemplo 1, los Ejemplos 2-10 se prepararon a partir de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo [1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 3 del Ejemplo 1) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-11, y N-desprotección en condiciones similares a las de la Etapa 4 del Ejemplo 1, seguido de N-arilación con los haluros de arilo adecuados, que estaban comercialmente disponibles, en condiciones similares a las de la Etapa 5 del Ejemplo 1.

El Ejemplo 2 se analizó usando HPLC analítica Método A y LCMS analítica Método A. Los Ejemplos 3-10 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.



Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [ <i>m/z</i> (M+H)]
2	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopiridin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il) amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			2,873	458,30

3	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,360	457,20
4	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,101	501,25
5	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((S)-2-hidroxiopropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,159	488,23
6	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-2-hidroxiopropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,116	487,23
7	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-2-hidroxiopropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,159	488,23
8	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,237	502,24
9	2-(1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metil-1-(5-(trifluorometil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,470	550,20
10	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((S)-2-hidroxiopropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,072	487,23

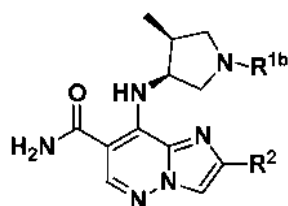
### Ejemplos 11-16

Los Ejemplos 11-16 se prepararon a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, bromhidrato (de la Etapa 2 del Ejemplo 1) mediante N-arilación con 2-cloropirimidina-5-carbonitrilo o bromo-piridina siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 5 del Ejemplo 1 y mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-12 siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 1.

5

Los Ejemplos 11-16 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.

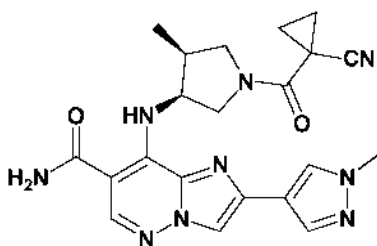
10



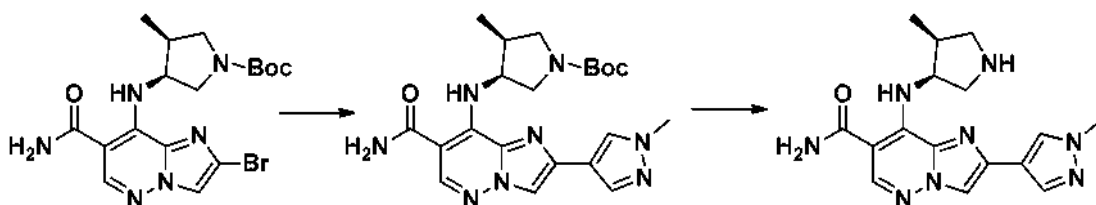
Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS[m/z(M+H)]
11	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-isopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,309	472,23
12	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-2-hidroxi-3-metoxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,102	518,24
13	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,174	458,22
14	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopirimidin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-propil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,309	472,23
15	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopiridin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)aminopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,458	471,24
16	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopiridin-2-il)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,379	541,2

### 5 Ejemplo 17

8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



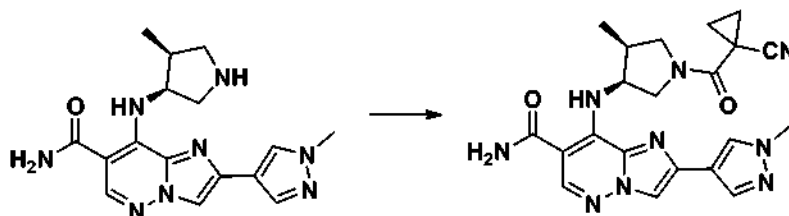
Etapa 1: 2-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



A un vial de reacción cargado con (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 3 del Ejemplo 1, 300 mg, 0,683 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (426 mg, 2,049 mmol) y aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (55,8 mg, 0,068 mmol) se añadieron dioxano (4,553 ml) y fosfato de potasio, tribásico (1024 µl, 2,049 mmol). La suspensión se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 90 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró y se concentró a presión reducida, proporcionando un aceite oscuro. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un aceite. El aceite en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna de gel de sílice ISCO, eluyentes 0-10 % DCM-MeOH) para dar (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo en forma de un sólido de color amarillo. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 8,33 (s, 1H), 8,03 - 7,95 (m, 2H), 7,86 (s, 1H), 6,07 - 5,86 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,85 - 3,73 (m, 1H), 3,72 - 3,62 (m, 1H), 3,57 - 3,45 (m, 1H), 3,23 - 3,14 (m, 1H), 2,67 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 1,46 (d, J = 13,0 Hz, 9H), 1,16 - 1,06 (m, 3H). ESI-MS (LCMS analítica Método B): m/z 441,3 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 3,123 min.

A una solución de (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo en DCM (4.5 ml) a 0 °C se añadió TFA (526 µl, 6,83 mmol) gota a gota. La reacción se agitó a 0 °C durante 10 minutos y a temperatura ambiente durante 1,5 h. La solución de reacción se concentró para producir un aceite de color amarillo, que se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar 2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, 2 TFA (333.5 mg, 0,587 mmol, rendimiento del 86 %) en forma de un sólido de color amarillo. ESI-MS (LCMS analítica Método B): m/z 341,2 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 1,847 min.

Etapa 2: 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



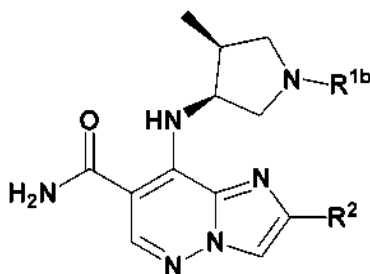
A una solución de ácido cianociclopropanocarbónico (3,67 mg, 0,033 mmol) en DCM (330 µl) se añadieron DIEA (14,41 µl, 0,083 mmol) y BOP (17,52 mg, 0,040 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. 2-(1-Metil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (15 mg, 0,033 mmol) se añadió a lo anterior. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante otros 30 min y se concentró para dar un aceite de color naranja. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante LCMS preparativa (prep. LCMS Método A) para proporcionar 8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (8,5 mg, 0,020 mmol, rendimiento del 59,4 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN <sup>1</sup>H

(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 2 rotámeros) δ 10,74 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 10,69 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,48 (s a, 1H), 8,47 (s a, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,12 (s, 2H), 8,01 (s a, 2H), 7,88 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,41 (s a, 2H), 6,00 - 5,88 (m, 1H), 5,82 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,25 (dd, *J*=10,9, 5,0 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J*=10,2, 7,7 Hz, 2H), 3,92 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 3,88 (s, 6H), 3,79 (dd, *J*=12,6, 5,2 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J*=12,1, 7,7 Hz, 1H), 3,58 (s, 1H), 3,54 - 3,50 (m, 1H), 2,80 - 2,74 (m, 1H), 2,72 - 2,65 (m, 1H), 1,64 - 1,52 (m, 6H), 1,50 - 1,45 (m, 1H), 1,39 - 1,34 (m, 1H), 1,08 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,04 (d, *J*=6,9 Hz, 3H). HPLC/LCMS (Método F): *m/z* 434,10 ([M+H]<sup>+</sup>), Tr. 1,066 min.

### Ejemplos 18-22

10 De acuerdo con el procedimiento descrito para el Ejemplo 17, Los Ejemplos 18-22 se prepararon a partir de (3*S*,4*S*)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-*b*]piridazin-8-il)amino)-4-metilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 3 del Ejemplo 1) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-12, y N-desprotección en condiciones similares a las de la Etapa 1 del Ejemplo 17 y amidación con los ácidos adecuados en condiciones similares a las de la Etapa 2 del Ejemplo 17.

Los Ejemplos 18-22 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.



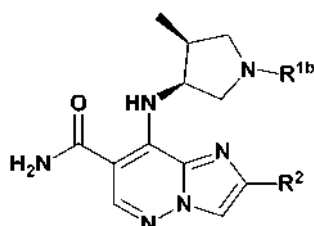
20

Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS[ <i>m/z</i> (M+H)]
18	8-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,213	448,22
19	8-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-(1-cianociclobutanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,121	448,10
20	8-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,076	492,20
21	8-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(( <i>S</i> )-2-hidroxi-2-propil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,031	478,15
22	8-(((3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-1-(3-ciano-oxetano-3-carbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,072	450,1

## Ejemplos 23-35

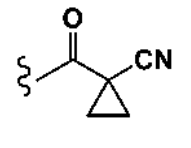
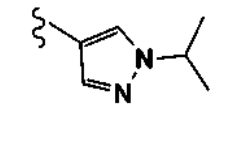
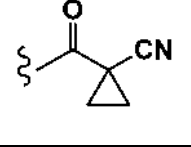
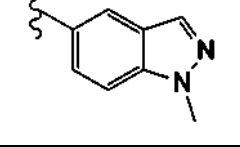
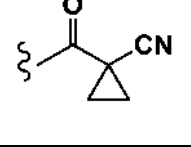
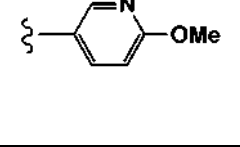
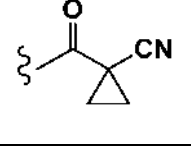
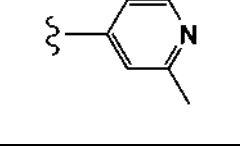
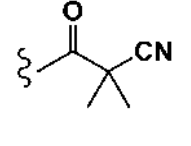
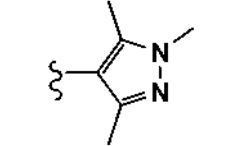
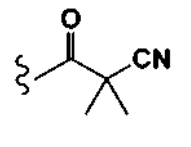
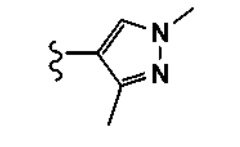
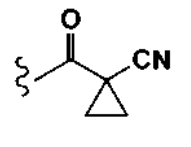
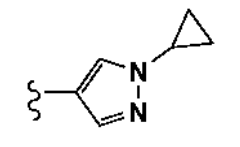
Los Ejemplos 23-35 se prepararon a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (de la Etapa 2 del Ejemplo 1) mediante amidación con el ácido adecuado siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 2 del Ejemplo 17 y mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-12 siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 1 del Ejemplo 17.

Los Ejemplos 23-35 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.



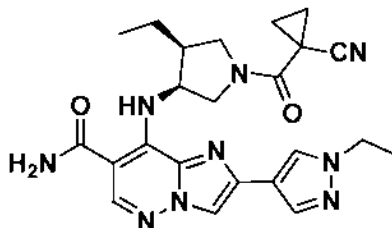
Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS[m/z(M+H)]
23	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-5-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,189	434,20
24	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-2-hidroxi-3-metoxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,087	508,24
25	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3,5-trimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,087	462,24
26	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,184	448,22
27	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			531,50	532,20
28	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-propil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,229	462,24



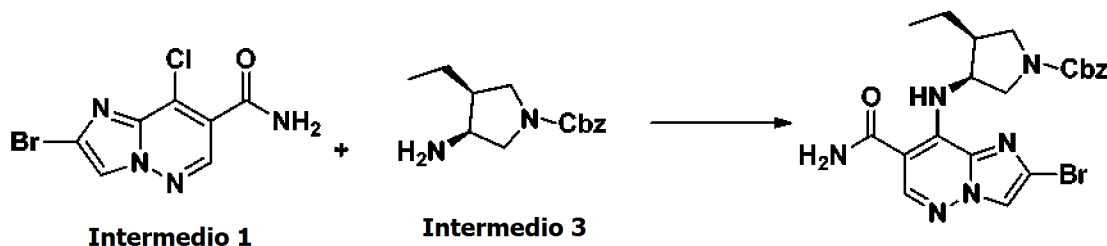
29	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-isopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,222	462,24
30	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-indazol-5-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,264	484,22
31	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(6-metoxipiridin-3-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,276	461,20
32	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(2-metilpiridin-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			0,988	445,21
33	8-(((3S,4S)-1-(2-ciano-2-metilpropanoil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3,5-trimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,191	464,25
34	8-(((3S,4S)-1-(2-ciano-2-metilpropanoil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,203	450,24
35	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,291	460,22

**Ejemplo 36**

5 8-(((3S,4S)-1-(5-Cianopiridin-2-il)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

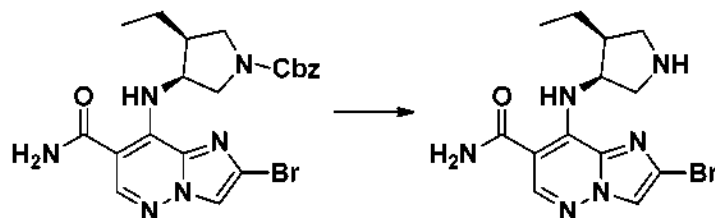


10 Etapa 1 (3S,4S)-3-((2-Bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo



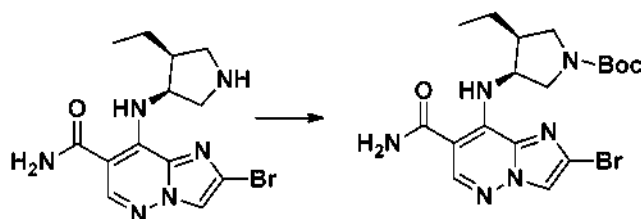
Una solución de 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (0,940 g, 3,41 mmol), (3S,4S)-3-amino-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (1,017 g, 4,09 mmol) y base de Hunig (1,788 ml, 10,24 mmol) en DMF (3.0 ml) en un vial de reacción se agitó a 90 °C durante 2 h. La solución de reacción se añadió lentamente a una mezcla de hielo con agua en agitación dando como resultado un precipitado de color castaño claro. La suspensión se agitó durante 30 min a 0 °C. Después de la filtración, se recogió (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo en forma de un sólido de color castaño claro (1,716 g, 3,52 mmol, rendimiento del 100 %). ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  489,1, 487,1 ( $[M+H]^+$ ).

Etapa 2: 2-Bromo-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato



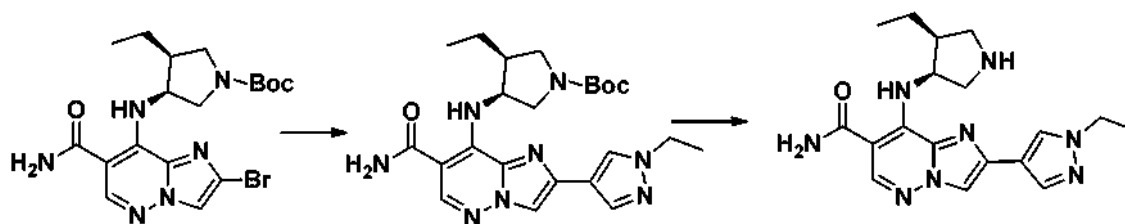
A una suspensión de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de bencilo (1000 mg, 2,052 mmol) en acetonitrilo (8 ml) y DCM (4 ml) se añadió yodotrimetilsilano (1,117 ml, 8,21 mmol) gota a gota a TA. La solución resultante de color rojo oscuro transparente se agitó a ta durante 1,3 h formando un precipitado de color amarillo. La reacción se inactivó con MeOH (2 ml) a 0 °C, y se agitó a 0 °C durante 30 min. El producto deseado, 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato se recogió por filtración en forma de un sólido de color castaño claro (795 mg, 1,65 mmol, rendimiento del 80 %). ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  353,0 ( $[M+H]^+$ ).

Etapa 3: (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo



El sólido de color castaño anteriormente mencionado (795 mg, 1,65 mmol) en DCM (4 ml) se trató con base de Hunig (1,792 ml, 10,26 mmol) seguido de adición lenta de una solución de BOC<sub>2</sub>O (0,715 ml, 3,08 mmol) en DCM (4 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se repartió entre agua y DCM. La fase orgánica se lavó con salmuera, secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar un sólido de color pardo, que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna ISCO 12 g, 20-50 % EtOAc/hex) para proporcionar (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo en forma de un sólido de color blanco (735 mg, 1,611 mmol, rendimiento del 97,6 %). ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  455,0 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 3,855 min.

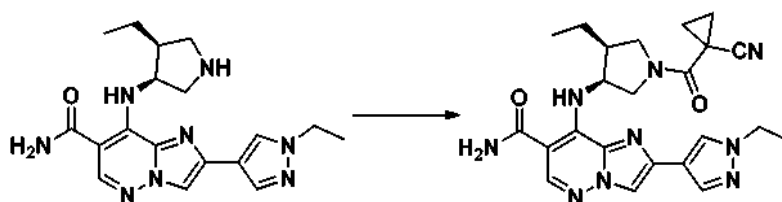
Etapa 4: 2-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



Una solución de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (200 mg, 0,441 mmol), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (147 mg, 0,662 mmol) en  $K_3PO_4$  ac 2 M (0,662 ml, 1,324 mmol) y dioxano (2 ml) se purgó con  $N_2$  durante 2 min, seguido de la adición de aducto  $PdCl_2(dppf)$   $CH_2Cl_2$  (1:1) (36,3 mg, 0,044 mmol). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno durante 2 min, se precipitó y se calentó a 100 °C durante 120 min. La mezcla de reacción se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con salmuera, se filtró a través de CELITE®, se secó ( $Na_2SO_4$ ) y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna ISCO 12 g, 20-80 % EtOAc/hexano durante 15 min) para proporcionar (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo en forma de un sólido de color blanquecino.

Este sólido se recogió en DCM (3.0 ml) y se trató con TFA (0,204 ml, 2,65 mmol) durante una noche. La retirada del disolvente dio como resultado 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (162 mg, 0,336 mmol, rendimiento del 76 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  369,1 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 2,313 min.

Etapa 5: 8-(((3S,4S)-1-(5-Cianopiridin-2-il)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

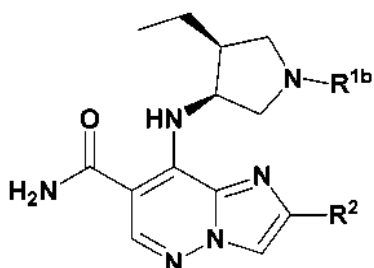


Una solución de 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (11 mg, 0,023 mmol), ácido 1-cianociclopropanocarboxílico (5,07 mg, 0,046 mmol), HATU (13,00 mg, 0,034 mmol) y DIPEA (0,020 ml, 0,114 mmol) en DMF (0.4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. El material en bruto se purificó mediante LC/MS preparativa (LC/MS preparativa Método A). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación por centrifugación para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 36 (8 mg, 0,017 mmol, rendimiento del 76 %). RMN  $^1H$  (500 MHz, metanol- $d_4$ , 2 rotámeros)  $\delta$  8,52 (d,  $J=7,4$  Hz, 2H), 8,17 (s, 1H), 8,12 (d,  $J=2,5$  Hz, 2H), 8,10 (s, 1H), 8,05 (d,  $J=5,0$  Hz, 2H), 6,20 (t,  $J=4,2$  Hz, 1H), 6,19 - 6,16 (m, 1H), 4,57 (dd,  $J=11,4, 5,0$  Hz, 1H), 4,51 - 4,46 (m, 1H), 4,45 - 4,38 (m, 6H), 4,07 - 4,02 (m, 2H), 3,97 (t,  $J=10,9$  Hz, 1H), 3,59 (t,  $J=11,4$  Hz, 1H), 2,84 - 2,75 (m, 1H), 2,73 - 2,65 (m, 1H), 2,03 - 1,98 (m, 1H), 1,96 - 1,81 (m, 4H), 1,81 - 1,73 (m, 4H), 1,73 - 1,63 (m, 8H), 1,62 - 1,58 (m, 1H), 1,21 (t,  $J=7,4$  Hz, 3H), 1,18 (t,  $J=7,4$  Hz, 3H). HPLC/LCMS (Método F):  $m/z$  461,20 ( $[M+H]^+$ ), Tr. 1,30 min.

### 35 Ejemplos 37-39

De acuerdo con el procedimiento descrito para el Ejemplo 36, Los Ejemplos 37-39 se prepararon a partir de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 3 del Ejemplo 36) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles y N-desprotección de N-Boc en condiciones similares a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36 y amidación con los ácidos adecuados en condiciones similares a las de la Etapa 5 del Ejemplo 36.

Los Ejemplos 37-39 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.

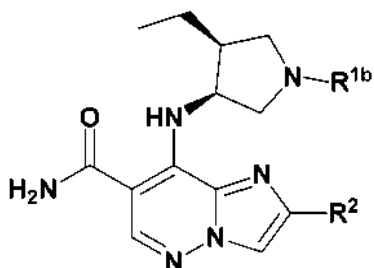


Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
37	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclobutanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,38	475,2
38	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclobutanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,136	449,15
39	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,144	448,10

## 5 Ejemplos 40-51

Los Ejemplos 40-51 se prepararon a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (de la Etapa 2 del Ejemplo 36) mediante amidación con los ácidos adecuados siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 5 del Ejemplo 36 y mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-12 siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36.

Los Ejemplos 40-51 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.



15

Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
40	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(quinolin-6-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,075	495,23

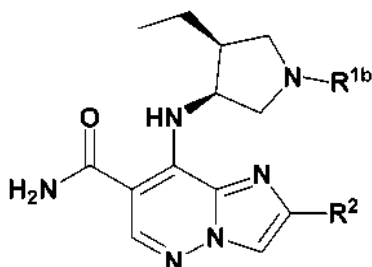
41	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(2-metilpiridin-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,128	475,22
42	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-indazol-5-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,334	498,24
43	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3,5-trimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,15	476,4
44	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-5-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,20	448,4
45	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			2,74	462,3
46	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,279	520,28
47	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,397	474,24
48	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-propil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,464	476,25
49	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-3-il)imidazo [1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,292	448,22
50	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(2,4-dimetiltiazol-5-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,299	479,20

51	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-isopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,327	480,23
----	--	--	--	-------	--------

**Ejemplo 52**

5 El Ejemplo 52 se preparó a partir de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-etilpirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (de la Etapa 3 del Ejemplo 36) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-12 y N-desprotección siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36, y N-arilación con haluros de alquilo adecuados, que estaban comercialmente disponibles, siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 5 del Ejemplo 1.

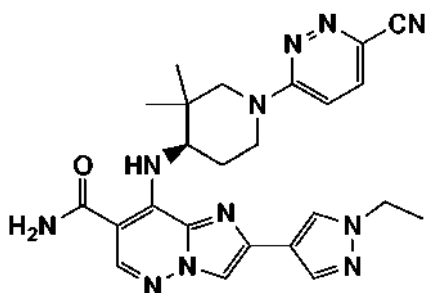
10 El Ejemplo 52 se analizó usando HPLC/LCMS analítico Método F.



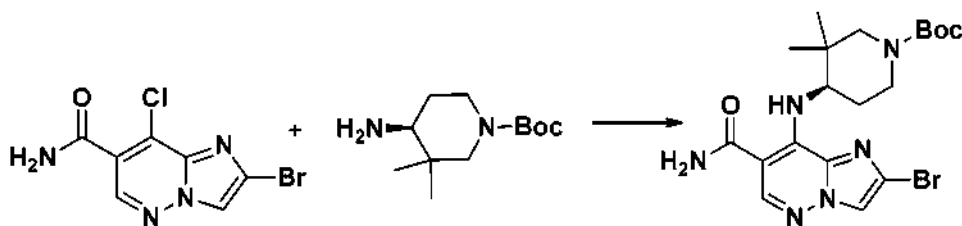
Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
52	8-(((3S,4S)-1-(5-cianopiridin-2-il)-4-etilpirrolidin-3-il) amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,30	456,2

**Ejemplo 53**

20 (R)-8-(((1-(6-Cianopiridazin-3-il)-3,3-dimetilpiperidin-4-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



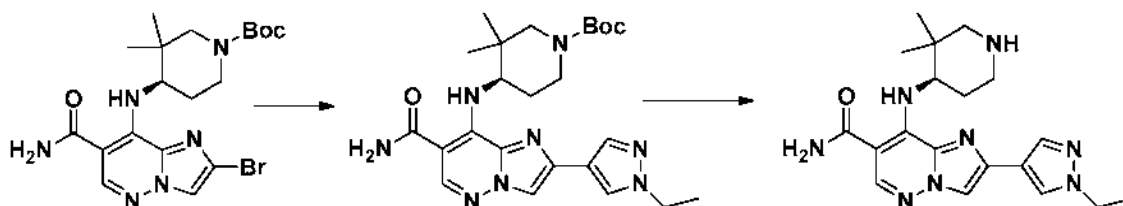
25 Etapa 1: (R)-*terc*-Butil 4-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato



Intermedio 4

A una solución de 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (170 mg, 0,617 mmol) y (*R*)-4-amino-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (144 mg, 0,633 mmol) en DMF (1543  $\mu$ l) se añadió DIEA (237  $\mu$ l, 1,358 mmol). La reacción se calentó a 90 °C durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se repartió entre agua y acetato de etilo (100 ml). La capa de acetato de etilo se lavó con agua (3x 100 ml), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida. El sólido en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna ISCO de gel de sílice, 0-10 % MeOH-DCM) para proporcionar (*R*)-4-((2-bromo-7-carbamoilimidazo [1,2-b]piridazin-8-il)amino)-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (255 mg, 0,546 mmol, rendimiento del 88 %) en forma de un sólido de color amarillo desvaído. ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  467,0 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 3,413 min.

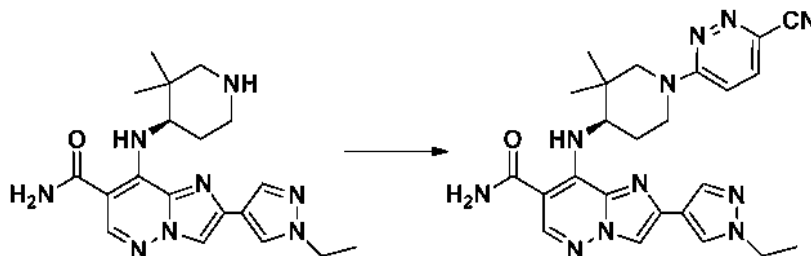
Etapa 2: (+/-)-6-Bromo-4-(1-(6-cianopiridazin-3-il)-3,3-dimetilpiperidin-4-ilamino)pirrolo[1,2-b]piridazina-3-carboxamida



A un vial de reacción cargado con (*R*)-4-((2-bromo-7-carbamoilimidazo [1,2-b]piridazin-8-il)amino)-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (69.1 mg, 0,148 mmol), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (65,7 mg, 0,296 mmol) y aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12,07 mg, 0,015 mmol) en dioxano (986  $\mu$ l) se añadió fosfato de potasio, dibásico (222  $\mu$ l, 0,444 mmol). La suspensión se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 100 °C durante 2 h. La reacción se diluyó metanol (10 ml), se filtró, y se concentró. El aceite de color marrón resultante se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar un aceite. El aceite se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna ISCO de gel de sílice, 0-100 % EtOAc/hexanos) para proporcionar (*R*)-4-((7-carbamoil-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (62,2 mg, 0,129 mmol, rendimiento del 87 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (LCMS analítica Método B):  $m/z$  483,1 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 3,345 min

El sólido de color blanco anteriormente mencionado se recogió en DCM (986  $\mu$ l) y se enfrió a 0 °C. Se añadió TFA (11,39  $\mu$ l, 0,148 mmol). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de 2 h, la solución de reacción se concentró, proporcionando un aceite de color amarillo. El aceite se diluyó con acetato de etilo, se lavó sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato sódico, agua, y solución saturada de cloruro sódico, se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para proporcionar (*R*)-8-((3,3-dimetilpiperidin-4-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (57,8 mg, 0,116 mmol, rendimiento del 79 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI-MS (LCMS analítica Método B):  $m/z$  383,2 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 2,093 min

Etapa 3: (*R*)-8-((1-(6-Cianopiridazin-3-il)-3,3-dimetilpiperidin-4-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

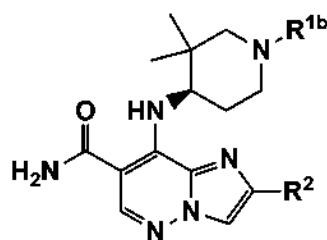


A una solución de (*R*)-8-((3,3-dimetilpiperidin-4-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (13 mg, 0,026 mmol) en DMF (105  $\mu$ l), se añadieron DIEA (22,87  $\mu$ l, 0,131 mmol) y 6-cloropiridazina-3-carbonitrilo (4,02 mg, 0,029 mmol). La reacción se calentó a 90 °C. Después de 2 h, la reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó a través de LC/MS preparativa (Método A). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación por centrifugación para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 53 (9,2 mg, 0,019 mmol, rendimiento del 72,4 %). RMN <sup>1</sup>H (500MHz, metanol-d<sub>4</sub>)  $\delta$  8,33 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,60 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1H), 7,22 (d,  $J = 9,9$  Hz, 1H), 5,77 - 5,67 (m, 1H), 4,33 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H), 4,26 (c,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 3,49 - 3,41 (m, 1H), 3,26 - 3,19 (m, 1H), 2,35 - 2,27 (m, 1H), 1,91 - 1,80 (m, 1H), 1,54 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 1,43 - 1,38 (m, 1H), 1,14 (s, 3H), 1,10 (s, 3H). LC/MS (Método F):  $m/z$  486,24 ( $[M+H]^+$ ), Tr. 1,400 min.

**Ejemplo 54**

De acuerdo con el procedimiento descrito para el Ejemplo 53, El Ejemplo 54 se preparó a partir de (*R*)-4-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-*b*]piridazin-8-il)amino)-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 1 del Ejemplo 53) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles y N-desprotección de N-Boc en condiciones similares a las de la Etapa 2 del Ejemplo 53, y arilación con los haluros de alquilo adecuados en condiciones similares a las de la Etapa 3 del Ejemplo 53.

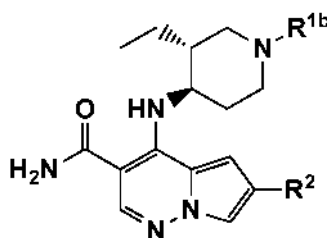
El Ejemplo 54 se analizó usando HPLC/LCMS analítico Método F.



Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
54	( <i>R</i> )-8-((1-(6-cianopiridazin-3-il)-3,3-dimetilpiperidin-4-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2- <i>b</i> ] piridazina-7-carboxamida			1,38	472,22

**Ejemplo 55**

El Ejemplo 55 se preparó según las condiciones descritas para el Ejemplo 45, donde el (*R*)-4-amino-3,3-dimetilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo se sustituyó por (3*R*,4*R*)-4-amino-3-etilpiperidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (Intermedio 5). El Ejemplo 55 se analizó usando HPLC/LCMS analítico Método F.

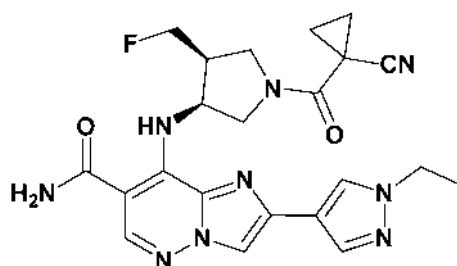


Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
55	8-(((3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-1-(6-cianopiridazin-3-il)-3-etilpiperidin-4-il) amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo [1,2- <i>b</i> ]piridazina-7-carboxamida			1,440	485,20

**Ejemplo 56**

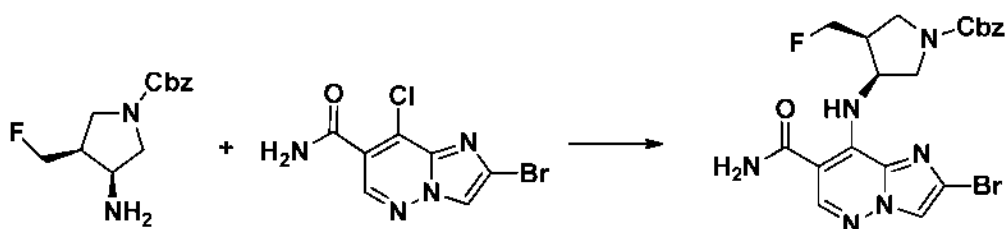
8-(((3*S*,4*S*)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-*b*]piridazina-7-carboxamida





Etapa 1: (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

5

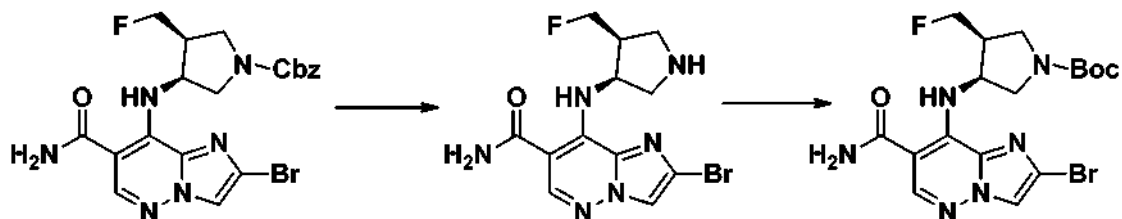


Intermedio 6

10 Una solución de (3S,4S)-3-amino-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo, TFA (468 mg, 1,278 mmol) y 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (352 mg, 1,278 mmol), DIEA (1116  $\mu$ l, 6,39 mmol) en DMA (5110  $\mu$ l) se calentó a 80 °C durante 7 h. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La solución de acetato de etilo se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para producir un aceite de color pardo. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (ISCO 12 g, 0-100 % EtOAc/hexano) para proporcionar (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (615,6 mg, 1,253 mmol, rendimiento del 98 %)

15 en forma de un sólido de color amarillo desvaído. ESI-MS (LCMS analítica Método B):  $m/z$  493,2 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método B) Tr: 3,148 min.

20 Etapa 2: (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo



25 A una suspensión de (3S,4S)-bencilo 3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato (240 mg, 0,488 mmol) en acetonitrilo (3 ml) a 0 °C se añadió yodotrimetilsilano (0,266 ml, 1,954 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min y a temperatura ambiente durante 1,5 h. La reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó con MeOH (2 ml). La suspensión resultante se agitó a 0 °C durante 30 min, se filtró, se lavó con etil éter, y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato en forma de un sólido de color blanquecino. ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  357,0 ( $[M+H]^+$ ).

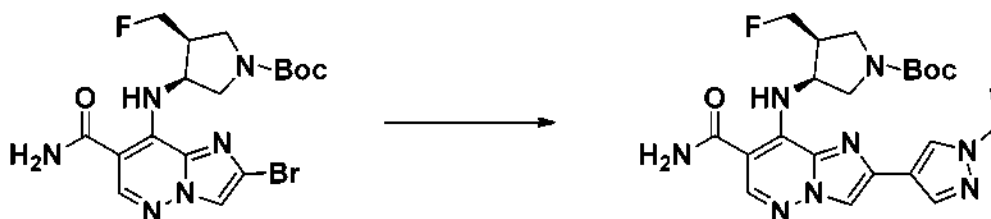
30

A una suspensión del sólido de color blanquecino anteriormente mencionado en DCM (5 ml) se añadió TEA (4 equiv.), seguido de adición lenta de una solución de BOC<sub>2</sub>O (209 mg 1,00 mmol) en DCM (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se repartió entre agua y DCM. La fase orgánica se lavó con salmuera, secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (columna ISCO de gel de sílice, 20-60 % EtOAc/hexano) dando como resultado (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (141 mg, 0,308 mmol, rendimiento del 63,1 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (LCMS analítica Método A):  $m/z$  457,0 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (HPLC analítica Método A) Tr: 3,60 min.

35

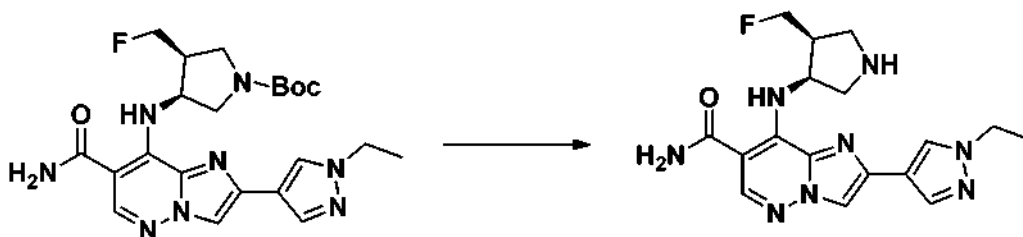
40

Etapa 3: (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *terc*-butilo



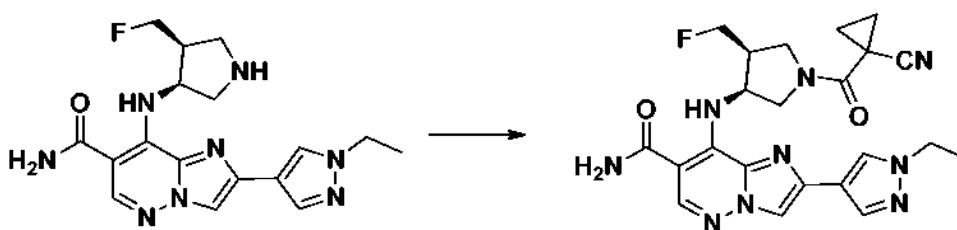
Una solución de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (22,2 mg, 0,049 mmol), 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (21,56 mg, 0,097 mmol), aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) (3,99 mg, 4,85 μmol) en dioxano (0,5 ml) y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ac 2 M (0,073 ml, 0,146 mmol) en un vial de reacción se purgó con N<sub>2</sub> durante 2 min. La mezcla de reacción se cerró herméticamente y se calentó a 100 °C durante 120 min. La mezcla de reacción se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con salmuera, se filtró a través de CELITE®, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna ISCO 12 g, 20-80 % EtOAc/hexano durante 15 min) para proporcionar (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (15 mg, 0,032 mmol, rendimiento del 65,4 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (Método A): *m/z* 473,4 ([M+H]<sup>+</sup>).

Etapa 4: 2-(1-Etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, 2 TFA



Una solución de (3S,4S)-3-((7-carbamoyl-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (15 mg, 0,032 mmol) en DCM (0,5 ml) se trató con TFA (0,024 ml, 0,317 mmol) a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró para dar 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, 2 TFA (15,1 mg, 0,025 mmol, rendimiento del 79 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (Método A): *m/z* 373,3 ([M+H]<sup>+</sup>).

Etapa 5: 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



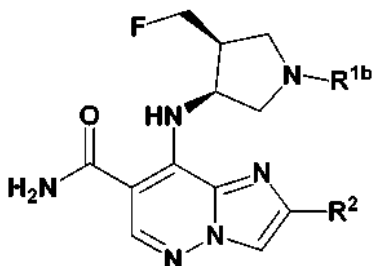
Una solución de 2-(1-etil-1H-pirazol-4-il)-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, TFA (15 mg, 0,031 mmol), ácido 1-cianociclopropanocarbónico (6,85 mg, 0,062 mmol), HATU (17,59 mg, 0,046 mmol) y DIPEA (0,027 ml, 0,154 mmol) en DMF (0,4 ml) en un vial de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 135 min. El material en bruto se purificó mediante LC/MS preparativa (Método A). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación por centrifugación para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 56 (8,5 mg, rendimiento del 59,2 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, dos rotámeros) δ 10,74 (d, *J*=8,9 Hz, 1H), 10,70 (d, *J*=8,4 Hz, 1H), 8,49 (s a, 1H), 8,47 (s a, 1H), 8,29 (s a, 1H), 8,28 (s a, 1H), 8,17 (s, 2H), 8,02 (s a, 2H), 7,90 (s, 2H), 7,43 (s a, 2H), 6,14 (s a, 1H), 6,06 (s a, 1H), 4,75 (d, *J*=5,4 Hz, 1H), 4,69 (d, *J*=6,4 Hz, 2H), 4,59 (d, *J*=6,9 Hz, 2H), 4,29 (dd, *J*=9,9, 5,9 Hz, 1H), 4,17 (c, *J*=7,4 Hz, 4H), 3,91 - 3,80 (m, 3H), 3,76 (dd, *J*=12,4, 8,9 Hz, 1H), 3,55 (d, *J*=10,9 Hz, 1H), 3,47 (dd, *J*=12,4, 7,4 Hz, 1H), 3,15 (dd, *J*=13,1, 6,2 Hz, 1H), 3,10 - 2,99 (m, 1H), 1,63 (s a, 2H), 1,60 - 1,49 (m, 6H), 1,40 (t, *J*=7,2 Hz, 6H). HPLC/LCMS (Método F): *m/z* 466,21 ([M+H]<sup>+</sup>), Tr. 1,118 min.

### Ejemplo 57

8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

De acuerdo con el procedimiento descrito para el Ejemplo 56, El Ejemplo 57 se preparó a partir de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoilimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(fluorometil)pirrolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (de la Etapa 2 del Ejemplo 56) mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con 1-etil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol en condiciones similares a las de la Etapa 3 del Ejemplo 56, desprotección de N-Boc en condiciones similares a las de la Etapa 3 del Ejemplo 56 y amidación con ácido 1-cianociclopropanocarbónico en condiciones similares a las de la Etapa 5 del Ejemplo 56.

El Ejemplo 57 se analizó usando HPLC/LCMS analítico Método F.

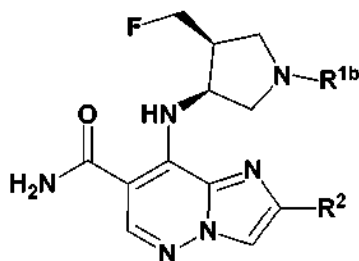


Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
57	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,089	452,20

#### Ejemplos 58-64

Los Ejemplos 58-64 se prepararon a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato (de la Etapa 2 del Ejemplo 56) mediante amidación con los ácidos adecuados siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 5 del Ejemplo 56 y reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 56.

Los Ejemplos 58-64 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.

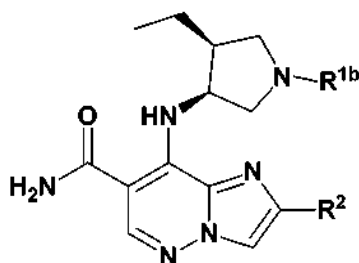


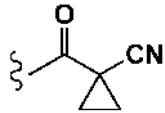
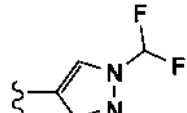
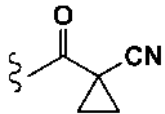
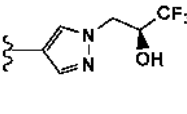
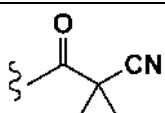
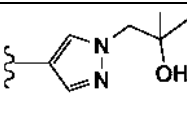
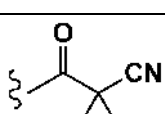
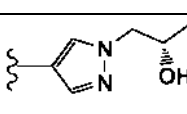
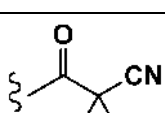
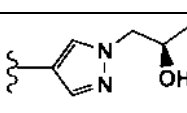
Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
58	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-propil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,327	480,23

59	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-isopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,316	480,23
60	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-ciclopropil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,259	478,21
61	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,250	487,2
62	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)aminometil-1H-indazol-5-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,447	546,22
63	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(2-metilpiridin-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,003	463,20
64	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(2-oxoindolin-6-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,193	503,19

### Ejemplos 65-69

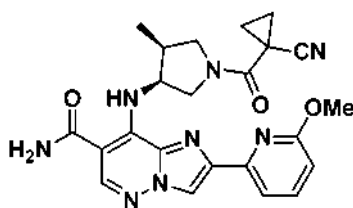
- 5 Los Ejemplos 65-69 se prepararon a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (de la Etapa 2 del Ejemplo 36) mediante amidación con los ácidos adecuados siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 5 del Ejemplo 36 y mediante reacción de acoplamiento de Suzuki con los ácidos borónicos adecuados que estaban comercialmente disponibles, o los ésteres de ácido borónico seleccionados a partir de los Intermedios 7-11, siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36.
- 10 Los Ejemplos 65-69 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.



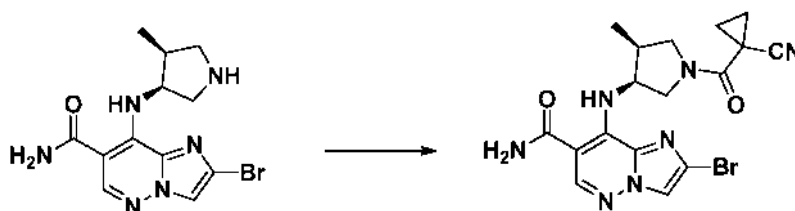
Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
65	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(difluorometil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,45	483,2
66	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,291	460,22
67	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,295	506,26
68	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((S)-2-hidroxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,224	492,25
69	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-((R)-2-hidroxipropil)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida			1,222	492,25

### Ejemplo 70

- 5 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(6-metoxipiridin-2-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



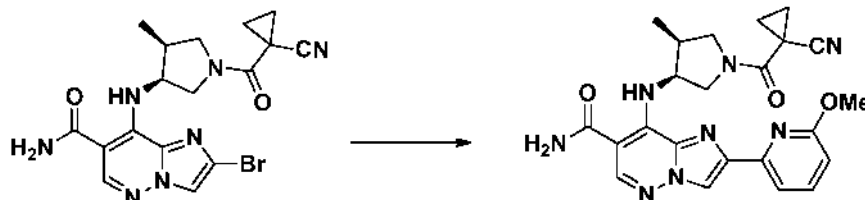
- 10 Etapa 1: 2-Bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



- 15 A una solución de ácido 1-cianociclopropanocarboxílico (0,264 g, 2,380 mmol) en DCM (15,9 ml) se añadieron DIEA (2,079 ml, 11,90 mmol) y BOP (1,263 g, 2,86 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se añadió 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, bromhidrato (de la Etapa 2 del Ejemplo 1, 1,00 g, 2,380 mmol). La reacción se agitó durante 1 h. Después de la retirada del disolvente, el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (ISCO, columna

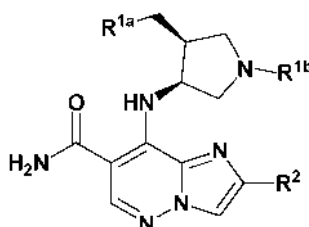
preempaquetada de gel de sílice eluyendo con 0-5 % EtOAc/Me-OH durante 15 volúmenes de columna) para proporcionar 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida en forma de un sólido de color blanco, 1,01 g, 2,336 mmol, rendimiento del 98 %. ESI-MS (Método B):  $m/z$  434,1 ( $[M+H]^+$ ). HPLC (Método B) Tr: 2,505 min.

5 Etapa 2: 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)-2-(6-metoxipiridin-2-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



10 Una solución de 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-metilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (30 mg, 0,069 mmol), 2-metoxi-6-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (40,8 mg, 0,174 mmol), cloruro de cobre(I) (7,21 mg, 0,073 mmol), carbonato de cesio (45,2 mg, 0,139 mmol) y aducto  $PdCl_2(dppf)-CH_2Cl_2$  (6,23 mg, 7,63  $\mu$ mol) en DMF (694  $\mu$ l) en un vial de reacción se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 150 °C durante 30 minutos. La reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró a través de CELITE® y se concentró. El aceite bruto resultante se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con salmuera, secó ( $Na_2SO_4$ ) y se concentró. El material en bruto se purificó a través de LC/MS preparativa (Método A). Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se secaron mediante evaporación por centrifugación para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 70 (3,4 mg, 7,38  $\mu$ mol, rendimiento del 10,64 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN  $^1H$  (500 MHz, 1:1 metanol: cloroformo deuterado)  $\delta$  8,42 - 8,36 (m, 2H), 7,77 - 7,69 (m, 2H), 6,73 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 4,35 - 4,25 (m, 2H), 4,02 (s, 3H), 3,90 - 3,75 (m, 2H), 3,41 (dd,  $J = 12,1, 8,7$  Hz, 1H), 2,93 - 2,75 (m, 1H), 1,82 - 1,72 (m, 1H), 1,68 - 1,50 (m, 3H), 1,24 (dd,  $J = 14,9, 6,9$  Hz, 3H). LC/MS (Método F):  $m/z$  461,10 ( $[M+H]^+$ ), Tr. 1,588 min.

## 25 Ejemplos 71-72



30 El Ejemplo 71 se preparó a partir de 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato (primer producto de la etapa 2 del Ejemplo 56) mediante amidación con ácido 2-ciano-2-metilpropanoico siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 1 del Ejemplo 70, reacción de acoplamiento de Suzuki 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36, y posterior eliminación del grupo Boc con TFA. El Ejemplo 72 se preparó de forma análoga al Ejemplo 71, mediante amidación of 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (de la Etapa 2 del Ejemplo 36) con ácido 1-cianociclopropanocarboxílico, reacción de acoplamiento de Suzuki con 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo, y posterior eliminación del grupo Boc con TFA.

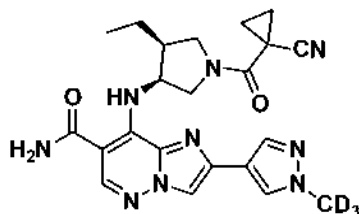
40 Los Ejemplos 71-72 se analizaron usando HPLC/LCMS analítico Método F.

Ej. N.º	Nombre	-R <sup>1a</sup>	-R <sup>1b</sup>	-R <sup>2</sup>	HPLC Tr (minutos)
71	8-(((3S,4S)-1-(2-ciano-2-metilpropanoil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida	F			1,025
72	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida	CH <sub>3</sub>			2,488

**Ejemplo 73**

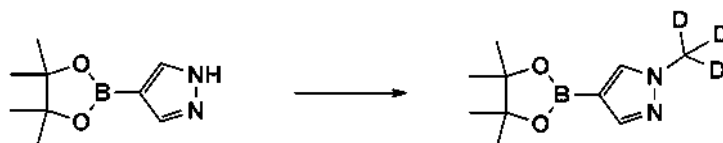
8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-d<sub>3</sub>)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida

5



Etapa 1: 1-(Metil-d<sub>3</sub>)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

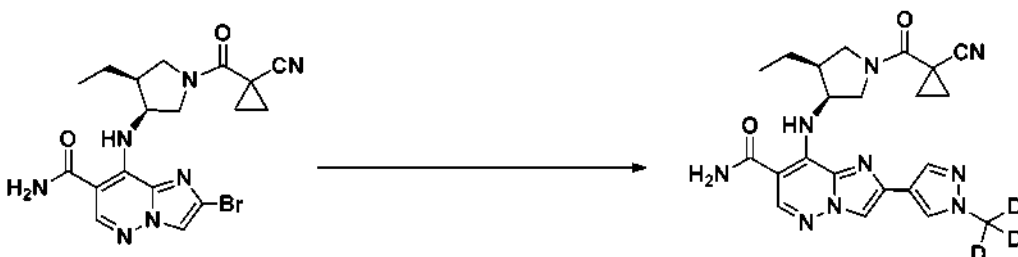
10



A una suspensión de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,8 g, 9,28 mmol) y carbonato potásico (6,41 g, 46,40 mmol) en acetonitrilo (34,5 ml), se añadió yodometano-d<sub>3</sub> (0,866 ml, 13,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 35 °C durante una noche. La suspensión se diluyó con DCM y se filtró. La torta del filtro de carbonato potásico se lavó con DCM. La evaporación del filtrado de DCM proporcionó un sólido de color amarillo desvaído. El sólido se trituró con DCM, se filtró y se concentró a presión reducida para dar 1-(metil-d<sub>3</sub>)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,46 g, 6,92 mmol, rendimiento del 74,6 %) que era un sólido de color amarillo desvaído. El producto en bruto se llevó a la siguiente etapa. ESI-MS (Método B): *m/z* 212,3 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 1,983 min.

20

Etapa 2: 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-d<sub>3</sub>)-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



25

Una solución de 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (1,00 g, 2,241 mmol), 1-(metil-d<sub>3</sub>)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1,419 g, 6,72 mmol) y aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,183 g, 0,224 mmol) en dioxano (14,94 ml) y fosfato de potasio ac. 2 M, tribásico (3,36 ml, 6,72 mmol) en un vial de reacción se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 90 °C durante 1 h. La reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró a través de CELITE® y se concentró. El aceite en bruto se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera, secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró. El material en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Isco, columna de gel de sílice preempaquetada eluyendo con 0-7 % DCM-MeOH durante 20 volúmenes de columna) para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 73 (516 mg, 1,134 mmol, rendimiento del 50,6 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400MHz, metanol-d<sub>4</sub>) δ 8,36 (d, *J*=3,7 Hz, 1H), 8,04 (d, *J*=7,7 Hz, 2H), 7,90 (d, *J*=7,0 Hz, 1H), 6,06 (s a, 1H), 4,38 - 4,17 (m, 2H), 3,90 - 3,70 (m, 2H), 2,71 - 2,49 (m, 1H), 1,78 - 1,45 (m, 6H), 1,07 - 0,94 (m, 3H). ESI-MS (Método B): *m/z* 451,4 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,663 min.

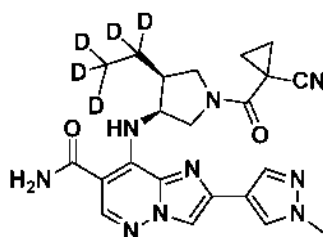
30

35

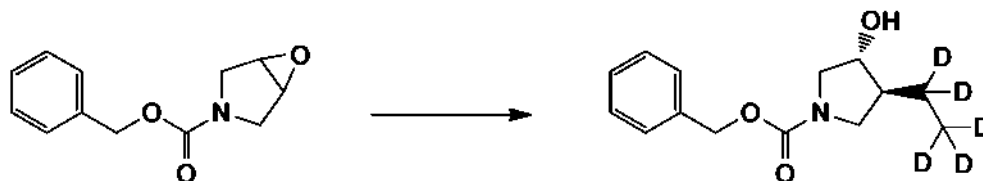
**Ejemplo 74**

40

8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



Etapa 1: (3SR,4RS)-3-(etil-d<sub>5</sub>)-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo



5

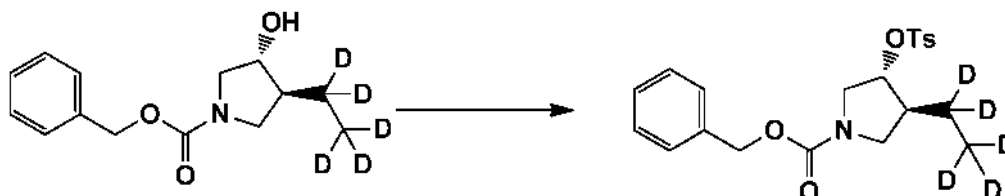
Se pulieron espirales de magnesio (8,95 g, 368 mmol) mediante agitación de las espirales durante una noche en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió THF (263 ml), y la solución en agitación se enfrió a 0 °C. Una solución en THF de bromoetano-d<sub>5</sub> (30 g, 263 mmol) se añadió gota a gota. La solución incolora transparente se agitó durante 90 min y se convirtió en una solución turbia grisácea. El bromuro de (etil-d<sub>5</sub>)magnesio se añadió gota a gota a una solución de 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.0]hexano-3-carboxilato de bencilo (22,5 g, 103 mmol 4,0 g, 18,25 mmol) y complejo de bromuro de cobre(I)-sulfuro de dimetilo (21,10 g, 103 mmol 3,75 g, 18,25 mmol) en THF (411 ml 73,0 ml) previamente enfriada a -40 °C. La reacción se agitó a -40 °C durante 2 h y después se calentó a 0 °C. La solución se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl (sat.) y la agitación continuó durante 30 min. La mezcla del producto se repartió entre EtOAc y agua. La fase orgánica se lavó con NH<sub>4</sub>Cl (sat.), salmuera, se filtró, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar un aceite de color amarillo. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (columna ISCO 15 g, 0-60 % EtOAc/hexano) para proporcionar (3SR,4RS)-3-(etil-d<sub>5</sub>)-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo (20,1 g, rendimiento del 77 %) en forma de un aceite incoloro trasparente. ESI-MS (Método A): *m/z* 255,3 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,345 min.

10

15

20

Etapa 2: (3SR,4RS)-3-(Etíl-d<sub>5</sub>)-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo

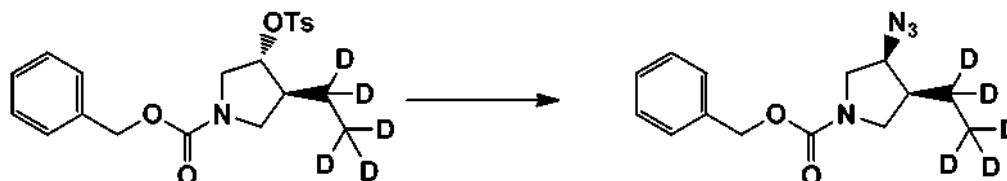


A una solución de (3SR,4RS)-3-(etil-d<sub>5</sub>)-4-hidroxipirrolidina-1-carboxilato de bencilo (20,7 g, 81 mmol) en piridina (80 ml) se añadió tosil-Cl (20,2 g, 106 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución de reacción se concentró a presión reducida, formando una suspensión de color blanco. La suspensión se diluyó con EtOAc y se filtró. El filtrado de EtOAc se lavó sucesivamente con agua, HCl 1,0N, agua, fosfato de potasio y cloruro sódico (sat.). La capa de EtOAc se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para dar un aceite incoloro. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (ISCO, columna de gel de sílice preempaquetada de 80 g eluyendo con 0-60 % EtOAc/hexano) para proporcionar (3SR,4RS)-3-(etil-d<sub>5</sub>)-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (24,6 g, 60,2 mmol, rendimiento del 74 %). ESI-MS (Método A): *m/z* 409,3 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 3,123 min.

25

30

Etapa 3: (3SR,4SR)-3-Azido-4-(etil-d<sub>5</sub>)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



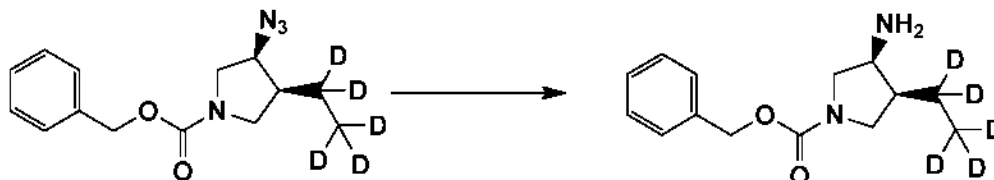
Una solución de (3SR,4RS)-3-(etil-d<sub>5</sub>)-4-(tosiloxi)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (24,6 g, 60,2 mmol) y azida sódica (9,78 g, 150,6 mmol) en DMF (50 ml) se purgó con nitrógeno durante 2 min. y después se calentó a 85 °C durante 5 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 1:1 de EtOAc / bicarbonato sódico (sat.)

40



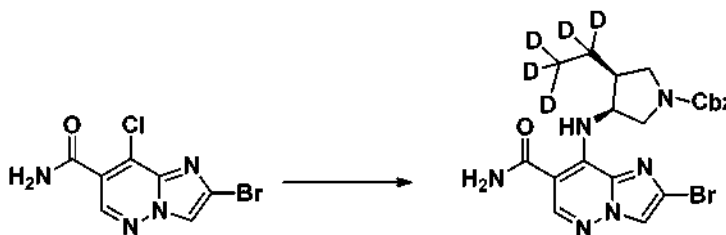
agua (200 ml/200 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua y cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida, proporcionando un aceite de color amarillo desvaído. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (ISCO, columna de gel de sílice preempaquetada de 80 g eluyendo con 0-60 % EtOAc/hexano) para proporcionar (3SR,4SR)-3-azido-4-(etil-d<sub>5</sub>)pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (14,6 g, 52,3 mmol, rendimiento del 87 %) en forma de un aceite incoloro transparente. ESI-MS (Método A): *m/z* 280,1 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,991 min.

Etapas 4: (3SR,4SR)-3-Amino-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



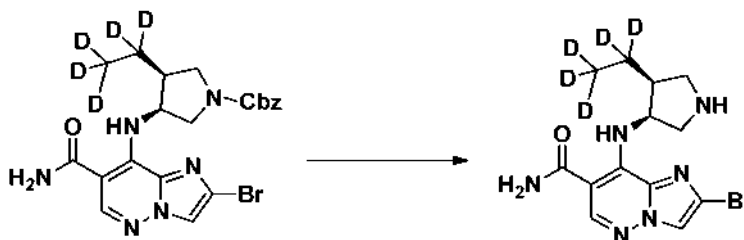
Se añadió trifetilfosfina (14,4 g, 54,9 mmol) a una solución de (3SR,4SR)-3-azido-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (14,6 g, 52,3 mmol) en acetonitrilo (198 ml) y agua (19,8 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se calentó a 60 °C durante una noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La mezcla del producto en bruto se recogió en HCl 0,5 N (~150 ml, ca pH = 1). La solución se lavó con EtOAc (3 x 100 ml) para retirar el óxido de trifetilfosfina y la trifetilfosfina residual. La capa acuosa se enfrió a 0 °C y se ajustó a pH 10 con NaOH 1,0 N. El producto se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Los extractos se combinaron, se lavaron con cloruro sódico (sat.), se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron para dar (3SR,4SR)-3-amino-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (12,36 g, 48,8 mmol, rendimiento del 93 %) en forma de un aceite incoloro transparente. ESI-MS (Método A): *m/z* 254,1 ([M+H]<sup>+</sup>).

Etapas 5: (3S,4S)-3-((2-Bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo



Una solución de (3S,4S)-3-amino-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (6,25 g, 24,67 mmol), 2-bromo-8-cloroimidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (6,80 g, 24,67 mmol) y DIEA (12,93 ml, 74,0 mmol) en DMA (32,9 ml) se calentó a 80 °C durante 3 h. La solución de reacción se repartió entre acetato de etilo (400 ml) y agua. La capa de acetato de etilo se lavó con LiCl al 10 % (2x 100 ml), agua, y salmuera; se secó con sulfato sódico, se filtró, y se concentró hasta la mitad de su volumen. La suspensión resultante se filtró y el producto en bruto se recogió en forma de un sólido de color castaño claro. El filtrado se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se concentró hasta la mitad de su volumen, y se filtró. Este proceso se repitió 3 veces para recoger más cantidad de producto. El producto en bruto combinado se purificó por cromatografía ultrarrápida (Isco, columna de gel de sílice preempaquetada eluyendo con 0-100 % EtOAc-hexanos durante 18 volúmenes de columna) para dar (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (9,84 g, 19,98 mmol, rendimiento del 81 %) en forma de un sólido de color amarillo desvaído. ESI-MS (Método A): *m/z* 494,1 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 3,380 min.

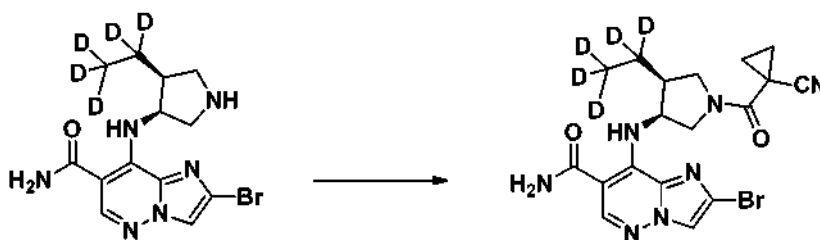
Etapas 6: 2-Bromo-8-(((3S,4S)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato



Se añadió TMS-I (1,015 ml, 7,46 mmol) gota a gota a una solución de (3S,4S)-3-((2-bromo-7-carbamoylimidazo[1,2-b]piridazin-8-il)amino)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidina-1-carboxilato de bencilo (1,224 g, 2,486 mmol) en

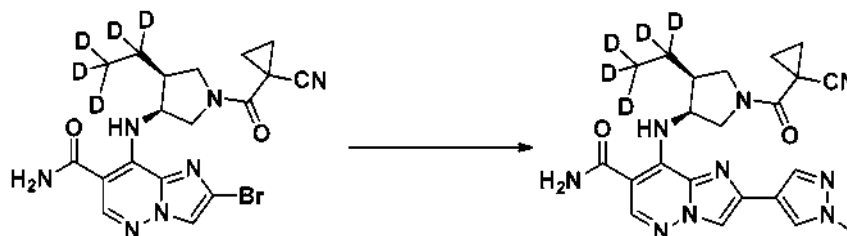
acetonitrilo (16.6 ml) a 0 °C. La solución de color amarillo resultante se agitó a 0 °C durante 10 minutos, después a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se enfrió a 0 °C, y se inactivó con metanol (1,00 ml). La suspensión resultante se agitó durante 30 minutos. La suspensión se filtró, se lavó con éter dietílico, y se secó al vacío, dando 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida, yodhidrato (1,209 g, 2,487 mmol, rendimiento del 100 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. ESI-MS (Método A): *m/z* 360,2 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 1,707 min.

Etapa 7: 2-Bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



Una solución de ácido 1-cianociclopropanocarboxílico (0,412 g, 3,71 mmol), DIEA (2,95 ml, 16,87 mmol) y BOP (1,791 g, 4,05 mmol) en DCM (20,5 ml) y DMF (2,045 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, momento en que se añadió 2-bromo-8-(((3S,4S)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (1,209 g, 3,37 mmol). La reacción se agitó durante otros 30 min. y se concentró para dar un aceite de color naranja. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa de acetato de etilo se lavó con LiCl al 10 %, y cloruro sódico (sat.); se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró. El material en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (Isco, columna preempaquetada de gel de sílice eluyendo con 0-10 % DCM-MeOH durante 12 volúmenes de columna) para proporcionar 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (1,42 g, 3,15 mmol, rendimiento del 93 %) en forma de un sólido de color blanco. ESI-MS (Método A): *m/z* 453,1 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,705 min.

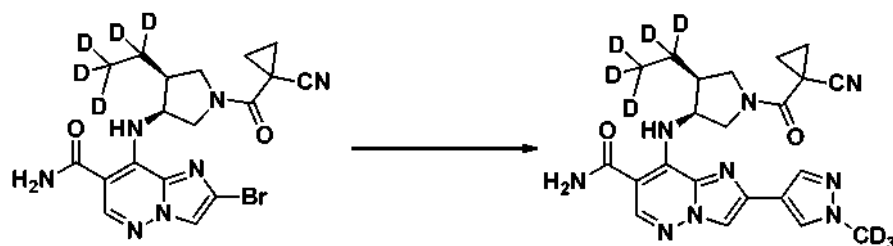
Etapa 8: 8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)pirrolidin-3-il)amino)-2-(1-metil-1H-pirazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



Una suspensión de 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (250 mg, 0,554 mmol), 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (346 mg, 1,662 mmol) y aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45.2 mg, 0,055 mmol) en dioxano (3693 µl) y fosfato de potasio ac. 2 M, tribásico (831 µl, 1,662 mmol) en un vial de reacción se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 90 °C durante 1 h. La reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró a través de CELITE® y se concentró para producir un aceite de color marrón oscuro. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró para dar un aceite. El aceite en bruto (in MeOH al 10 % en DCM) se absorbió sobre gel de sílice, se cargó en seco en la columna de gel de sílice, y se purificó mediante Isco (columna preempaquetada de gel de sílice eluyendo con 0-2 % de un sistema disolvente MeOH-EtOAc durante 3 volúmenes de columna) para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 74 (156 mg, 0,338 mmol, rendimiento del 61,0 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,47 (s, 1H), 8,26 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,87 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 6,06 - 5,83 (m, 1H), 4,22 - 4,12 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,80 - 3,68 (m, 1H), 3,67 - 3,53 (m, 1H), 3,19 (t, *J* = 11,1 Hz, 1H), 1,67 - 1,42 (m, 4H), 1,31 - 1,23 (m, 1H). ESI-MS (Método A): *m/z* 453,2 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,705 min.

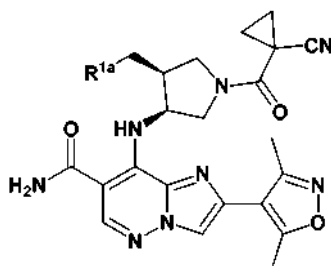
### Ejemplo 75

8-(((3S,4S)-1-(1-Cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)pirrolidin-3-il)amino)-2-[(1-metil-d<sub>3</sub>)-1H-pirazol-4-il]imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida



Una suspensión de 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(etil-d<sub>5</sub>)-pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida (de la Etapa 7 del Ejemplo 74, 2,5 g, 5,54 mmol), 1-(metil-d<sub>3</sub>)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (3,51 g, 16,62 mmol) y aducto PdCl<sub>2</sub>(dppf)-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,452 g, 0,554 mmol) y fosfato de potasio ac. 2 M, tribásico (8,31 ml, 16,62 mmol) en dioxano (37 ml) en un vial de reacción se purgó con nitrógeno durante 5 minutos. El vial se cerró herméticamente y se calentó a 90 °C durante 1 h. La reacción se diluyó con metanol (10 ml), se filtró a través de CELITE® y se concentró para producir a un aceite de color marrón oscuro. El aceite se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se lavó con cloruro sódico (sat.), se secó con sulfato sódico, se filtró, y se concentró para dar un aceite. El aceite en bruto (in MeOH al 10 % en DCM) se absorbió sobre gel de sílice, se cargó en seco en la columna de gel de sílice, y se purificó mediante Isco (eluyendo con 0-2 % de un sistema disolvente MeOH-EtOAc durante 3 volúmenes de columna) para proporcionar el compuesto del título del Ejemplo 75 (1,63 g, 3,54 mmol, rendimiento del 64,0 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,46 (s, 1H), 8,26 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 0,4 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,06 - 5,82 (m, 1H), 4,22 - 4,11 (m, 1H), 3,79 - 3,67 (m, 1H), 3,67 - 3,51 (m, 1H), 3,23 - 3,14 (m, 1H), 1,66 - 1,41 (m, 4H), 1,32 - 1,23 (m, 1H). ESI-MS (Método A): m/z 456,1 ([M+H]<sup>+</sup>). HPLC (Método B) Tr: 2,696 min.

#### Ejemplos 76-77



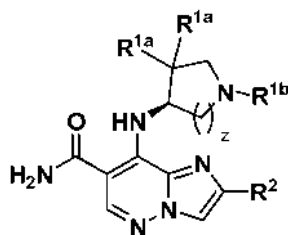
El Ejemplo 76 se preparó mediante reacción de acoplamiento de Suzuki de 2-bromo-8-(((3 S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida con 3,5-dimetil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)isoxazol siguiendo condiciones análogas a las de la Etapa 4 del Ejemplo 36. De forma análoga, el Ejemplo 77 se preparó mediante reacción de acoplamiento de Suzuki de 2-bromo-8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida con 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-carboxilato de *tert*-butilo.

El Ejemplo 76 se analizó usando HPLC analítico Método B y LCMS Método F; el Ejemplo 77 usando HPLC/LCMS analítico Método F.

Ej. N.º	Nombre	-R1a	HPLC Tr (minutos)	LCMS [m/z (M+H)]
76	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-(fluorometil)pirrolidin-3-il)amino)-2-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida	F	2,696	456,10
77	8-(((3S,4S)-1-(1-cianociclopropanocarbonil)-4-etilpirrolidin-3-il)amino)-2-(3,5-dimetilisoxazol-4-il)imidazo[1,2-b]piridazina-7-carboxamida	CH3	2,432	467,20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula II:



5

Fórmula II

o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10

R<sup>1a</sup> es independientemente cada vez que aparece H, F, Cl, Br, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>OR<sup>b</sup>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con 0-5 R<sup>a</sup> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-carbocíclico de 3-6 miembros sustituido con 0-2 R<sup>a</sup>;

15

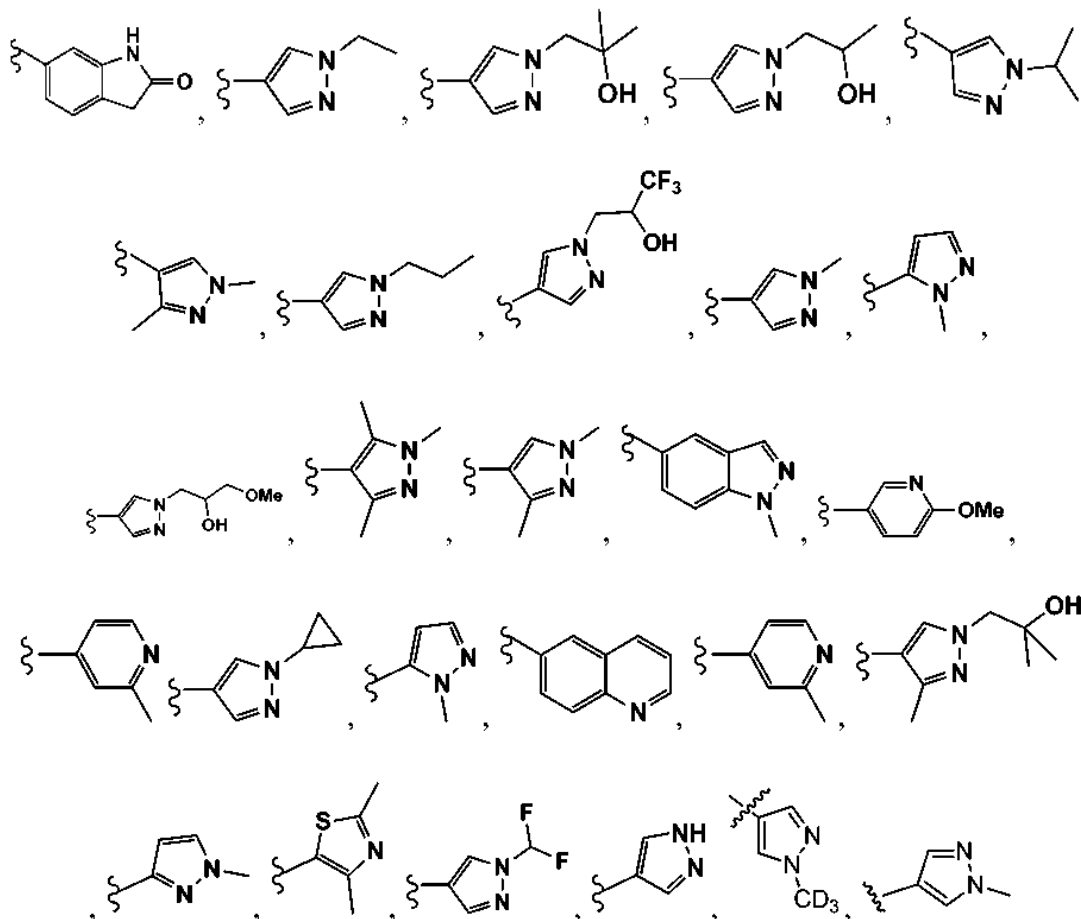
R<sup>1b</sup> es hidrógeno, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)R<sup>d</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)OR<sup>b</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>S(O)<sub>2</sub>R<sup>e</sup>, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con 0-2 R<sup>a</sup>, un -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S(O)<sub>p</sub> sustituido con 0-2 R<sup>a</sup>; o

un -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-heteroarilo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S sustituido con 0-2 R<sup>a</sup>;

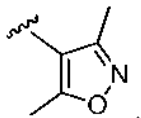
20

R<sup>1d</sup> es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub> sustituido con 0-2 R<sup>d</sup>, haloalquilo C<sub>1-6</sub>, C(O)NR<sup>c</sup>R<sup>c</sup>, cicloalquilo C<sub>3-6</sub> sustituido con 0-2 R<sup>d</sup> o (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-fenilo sustituido con 0-2 R<sup>a</sup>, un heterociclo de 4 a 10 miembros que contiene 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O y S, sustituido con 0-3 R<sup>a</sup>;

R<sup>2</sup> se selecciona de entre:



y



- 5  $R^a$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, D, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-(CH_2)_rOR^b$ ,  $-(CH_2)_rNR^cR^c$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-1  $R^f$  o haloalquilo  $C_{1-6}$ ;  
 $R^b$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$  o  $-(CH_2)_r$ -heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y  $S(O)_p$  sustituido con 0-1  $R^d$ ;  
 10  $R^c$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;  
 $R^d$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-OR^c$  o alquilo  $C_{1-6}$ ;  
 $R^e$  es independientemente cada vez que aparece alquilo  $C_{1-6}$ ;  
 $R^f$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, halo, CN,  $SO_2$ -metilo, fenilo,  $NH_2$ ,  $NHCO$ -metilo, OH u  $OCH_3$ ;  
 15 r es 0, 1, 2, 3 o 4;  
 p es 0, 1 o 2; y  
 z es 1 o 2.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde z es 1.

20

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde z es 2.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

25

$R^{1a}$  es independientemente cada vez que aparece H o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-5  $R^a$ ;  
 $R^{1b}$  es

- 30 i) hidrógeno,  $-(CH_2)_rC(O)R^{1d}$ ,  $-(CH_2)_rC(O)OR^b$  o  $-(CH_2)_rS(O)_2R^e$ ; o  
 ii) alquilo  $C_{1-6}$ , piridilo o piridazinilo, cada grupo sustituido con 0-2  $R^a$ ;

$R^{1d}$  es independientemente cada vez que aparece:

- 35 i) hidrógeno, haloalquilo  $C_{1-6}$  o  $C(O)NR^cR^c$ ;  
 ii) alquilo  $C_{1-6}$ , ciclopropilo, ciclobutilo u oxetano, cada grupo sustituido con 0-2  $R^d$ ; o  
 iii)  $(CH_2)_r$ -fenilo sustituido con 0-2  $R^a$ ;

$R^a$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, D, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-(CH_2)_rOR^b$ ,  $-(CH_2)_rNR^cR^c$ , alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-1  $R^f$  o haloalquilo  $C_{1-6}$ ;

40

$R^b$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$  sustituido con 0-2  $R^d$  o  $-(CH_2)_r$ -heterociclo de 5-7 miembros que comprende átomos de carbono y 1-4 heteroátomos seleccionados entre N, O, y  $S(O)_p$  sustituido con 0-1  $R^d$ ;

$R^c$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno o alquilo  $C_{1-6}$ ;

45

$R^d$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, F, Cl, Br,  $CF_3$ , CN,  $-OR^c$  o alquilo  $C_{1-6}$ ;

$R^e$  es independientemente cada vez que aparece alquilo  $C_{1-6}$ ;

r es independientemente cada vez que aparece 0, 1, 2, 3 o 4; y

p es independientemente cada vez que aparece 0, 1 o 2.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

50

$R^{1a}$  es independientemente cada vez que aparece H o alquilo  $C_{1-6}$  sustituido con 0-5  $R^a$ ;

$R^{1b}$  es  $-C(O)R^{1d}$ , piridilo o piridazinilo, cada grupo sustituido con 0-2  $R^a$ ;

55

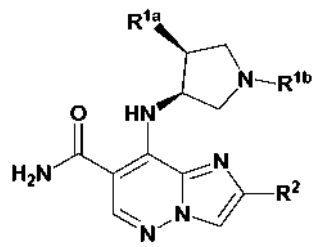
$R^{1d}$  es independientemente cada vez que aparece ciclopropilo, ciclobutilo u oxetano, cada grupo sustituido con 0-2  $R^d$ ;

$R^a$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno, D, F,  $CF_3$ , CN o  $-(CH_2)_rOR^b$ ;

$R^b$  es independientemente cada vez que aparece hidrógeno o  $C_{1-6}$  alquilo sustituido con 0-2  $R^d$ ; y

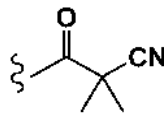
$R^d$  es CN.

60 6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene la fórmula III:

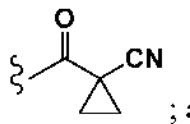


Fórmula III

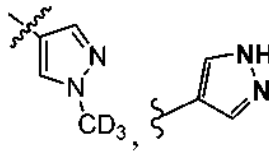
5 o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R<sup>1a</sup> se selecciona independientemente cada vez que aparece entre F, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> y C<sub>2</sub>D<sub>5</sub>; R<sup>1b</sup> se selecciona independientemente cada vez que aparece entre



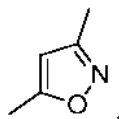
10 y



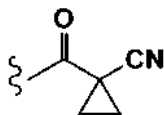
15 y R<sup>2</sup> se selecciona independientemente cada vez que aparece entre



20 y

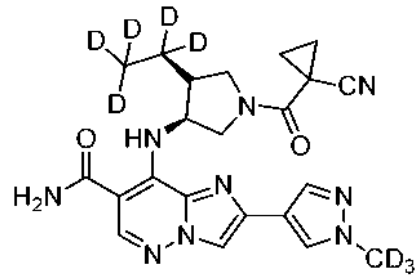


7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 en el que R<sup>1a</sup> es C<sub>2</sub>D<sub>5</sub> y R<sup>1b</sup> es



25

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene la fórmula estructural IV:



Fórmula IV.

- 5 9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en terapia para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria; o un estereoisómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.