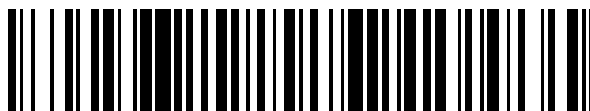


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 073**

51 Int. Cl.:

C07D 403/14 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2014** **E 17158350 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 3231801**

54 Título: **Sal de biperazole como inhibidor de JAK**

30 Prioridad:

17.05.2013 US 201361824683 P

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

17.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LI, YUN-LONG;
ZHUO, JINCONG;
QIAN, DING-QUAN;
MEI, SONG;
CAO, GANFENG;
PAN, YONGCHUN;
LI, QUN y
JIA, ZHONGJIANG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 720 073 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

Sal de bipirazole como inhibidor de JAK

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención proporciona una sal de 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidín-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida que es útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de JAK que incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunes, cáncer y otras enfermedades..

FONDO

Las proteína quinasas (PKs) regulan diversos procesos biológicos incluyendo el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación, la formación de órganos, la morfogénesis, la neovascularización, la reparación de tejidos y la regeneración, entre otros. Las proteína quinasas también desempeñan papeles especializados en una serie de enfermedades humanas incluyendo el cáncer. Las citoquinas, polipéptidos de bajo peso molecular o glicoproteínas, regulan muchas vías implicadas en la respuesta inflamatoria del huésped a la sepsis. Las citoquinas influyen en la diferenciación celular, la proliferación y la activación, y pueden modular tanto las respuestas proinflamatorias como las antiinflamatorias para permitir que el huésped reaccione apropiadamente a los patógenos. La señalización de una amplia gama de citocinas implica la familia de quinasa Janus (JAKs) de tirosina quinasas proteínicas y Transductores de Señal y Activadores de Transcripción (STATs). Existen cuatro JAKs de mamífero conocidos: JAK1 (Janus quinasa-1), JAK2, JAK3 (también conocida como quinasa Janus, leucocito, JAKL y L-JAK) y TYK2 (proteína quinasa-tirosina 2).

Las respuestas inmunes e inflamatorias estimuladas por citoquinas contribuyen a la patogénesis de enfermedades: patologías tales como inmunodeficiencia combinada grave (SCID) surgen de la supresión del sistema inmune, mientras que una respuesta hiperactiva o inapropiada inmune/inflamatoria contribuye a la patología de enfermedades autoinmunes (*por ejemplo*, asma, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, miocarditis), y enfermedades tales como la esclerodermia y la osteoartritis (Ortmann, RA, T. Cheng, et al (2000). *Arthritis Res* 2 (1): 16-32).

Las deficiencias en la expresión de JAK están asociadas con muchos estados de enfermedad. Por ejemplo, los ratones *Jak1* *-/-* son enanos al nacer, no se enferman y mueren perinatalmente (Rodig, SJ, MA Meraz et al. (1998) *Cell* 93 (3): 373-83). Los embriones de ratón *Jak2* *-/-* son anémicos y mueren aproximadamente el día 12,5 postcoitum debido a la ausencia de eritropoyesis definitiva.

La vía de JAK/STAT, y en particular los cuatro JAKs, se cree que desempeñan un papel en la patogénesis de la respuesta asmática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis y otras enfermedades inflamatorias relacionadas del tracto respiratorio inferior. Múltiples citocinas que señalizan a través de JAK se han relacionado con enfermedades/afecciones inflamatorias del tracto respiratorio superior, tales como las que afectan a la nariz y los senos (*por ejemplo*, rinitis y sinusitis) si las reacciones clásicamente alérgicas o no. La vía JAK/STAT también ha estado implicada en enfermedades inflamatorias/condiciones del ojo y respuestas alérgicas crónicas.

La activación de JAK/STAT en los cánceres se puede producir por la estimulación de citoquinas (*por ejemplo* IL-6 o GM-CSF) o por una reducción en los supresores endógenos de JAK de señalización tales como SOCS (supresor o señalización de citoquinas) o PIAS (inhibidor de proteína de STAT activado) (Boudny, V., y Kovarik, J., *Neoplasia*, 49: 349 - 355, 2002). La activación de la señalización STAT, así como otras vías aguas abajo de JAK (*por ejemplo*, Akt), se ha correlacionado con mal pronóstico en muchos tipos de cáncer (Bowman, T., et al *Oncogene*. 19: 2474-2488, 2000). Niveles elevados de citocinas circulantes que señalan a través de JAK/STAT juegan un papel causal en la caquexia y/o fatiga crónica. Como tal, la inhibición de JAK puede ser beneficiosa para pacientes de cáncer por razones que se extienden más allá de la actividad antitumoral potencial.

Tirosina quinasa JAK2 puede ser beneficiosa para pacientes con trastornos mieloproliferativos, *por ejemplo*, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM) (Levin, et al., *Cancer Cell*, vol. 7, 2005: 387 - 397). La inhibición de la quinasa JAK2V617F disminuye la proliferación de células hematopoyéticas, lo que sugiere JAK2 como un blanco potencial para la inhibición farmacológica en pacientes con PV, ET y MMM.

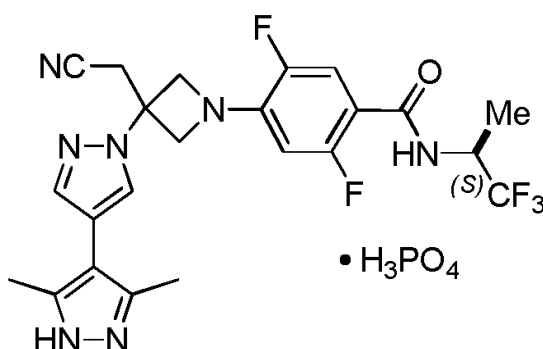
La inhibición de las JAK puede beneficiar a pacientes que sufren de los trastornos inmunológicos de la piel tales como la psoriasis, y sensibilización de la piel. Se cree que el mantenimiento de la psoriasis depende de una serie de citoquinas inflamatorias además de varias quimiocinas y factores de crecimiento (JCI, 113: 1664-1675), muchas de las cuales se señalan a través de JAK (*Adv Pharmacol.*, 2000, 47: 113-74).

Así, los agentes nuevos o mejorados que inhiben quinasas, tales como JAK se necesitan continuamente

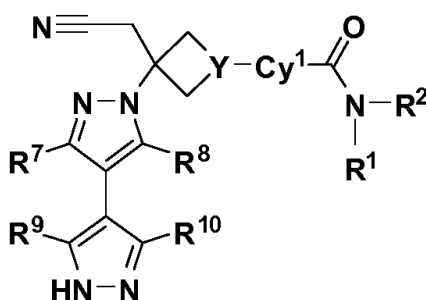
para desarrollar nuevos y más eficaces productos farmacéuticos que están destinados al aumento o la supresión de las vías inmunes e inflamatorias (tales como agentes inmunosupresores para trasplantes de órganos), así como agentes para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades que implican una respuesta inflamatoria hiperactiva (*por ejemplo*, eccema), alergias, cáncer (*por ejemplo*, próstata, leucemia, mieloma múltiple), y algunas de las reacciones inmunes (*por ejemplo*, erupción cutánea o dermatitis de contacto o diarrea) causada por otros agentes terapéuticos. Los compuestos de la invención, así como sus composiciones y métodos descritos en la presente memoria, están dirigidos hacia estas necesidades y otros fines.

RESUMEN

La presente invención proporciona, *entre otros*, una sal que es fosfato de 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina.-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida (Compuesto 1 fosfato) que tiene la fórmula:



También se describen en la presente, *entre otros*, compuestos de Fórmula I:



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; en la que Y, Cy¹, R¹, R², R⁷, R⁸, R⁹, y R¹⁰ se definen *infra*.

También se describen composiciones que comprenden un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen métodos para modular una actividad de JAK1 que comprenden poner en contacto JAK1 con un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describen métodos para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión o actividad anormal de la cinasa en un paciente administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune, un cáncer, un trastorno mieloproliferativo, un síndrome mielodisplásico (MDS), una enfermedad inflamatoria, una enfermedad de resorción ósea, o un rechazo de trasplante de órganos en un paciente con necesidad de ello, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describen compuestos de Fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cáncer, trastornos mieloproliferativos, síndromes mielodisplásicos (MDS), enfermedades inflamatorias, una enfermedad de resorción ósea o rechazo de trasplante de órganos.

También se describen compuestos compuestos de Fórmula I como se describe aquí, o sales farmacéuticamente inaceptables, para uso en la modulación de JAK1.

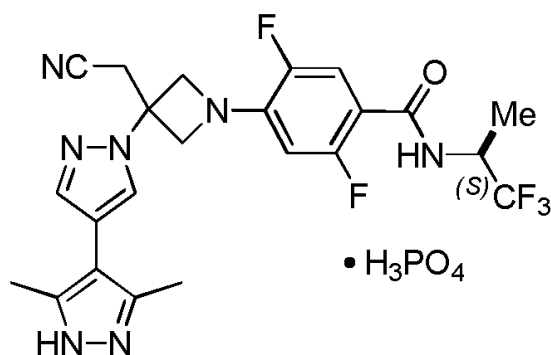
5 También se describen compuestos usos de compuestos de Fórmula I como se describe en el presente documento, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la preparación de medicamentos para uso en procedimientos de modulación de JAK1.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

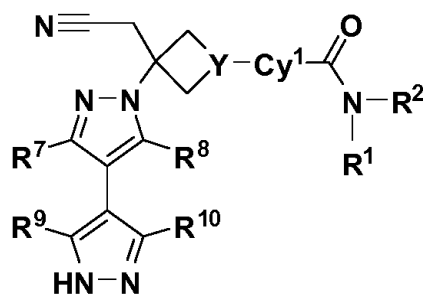
10 La Figura 1 muestra un patrón XRPD característico de la sal del Ejemplo 14.
 La Figura 2 muestra un patrón de XRPD característico de la sal del Ejemplo 15.
 La Figura 3 muestra un patrón de XRPD característico de la sal del Ejemplo 16.
 La Figura 4A muestra un termograma DSC característico de la sal del Ejemplo 17.
 La Figura 4B muestra los datos de TGA característicos de la sal del Ejemplo 17.
 15 La Figura 4C muestra un patrón de XRPD característico de la sal del Ejemplo 17.
 La Figura 5A muestra un termograma de DSC característico de la sal del Ejemplo 18.
 La Figura 5B muestra los datos de TGA característicos de la sal del Ejemplo 18.
 La Figura 5C muestra un patrón XRPD característico de la sal del Ejemplo 18.
 La Figura 6 muestra un patrón de XRPD característico de la sal del Ejemplo 19.
 20 La Figura 7A muestra un termograma DSC característico de la sal del Ejemplo 20.
 La Figura 7B muestra datos TGA característicos de la sal Sal del Ejemplo 20.
 La Figura 7C muestra un patrón XRPD característico de la sal del Ejemplo 20.
 La Figura 8A muestra un termograma DSC característico de la sal del Ejemplo 21.
 La Figura 8B muestra un patrón XRPD característico de la sal del Ejemplo 21.
 25 La Figura 9 muestra un patrón XRPD característico de la sal del Ejemplo 22.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 **[0016]** La presente invención proporciona, *entre otros*, una sal que es fosfato de 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidín-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida (Compuesto 1 fosfato) que tiene la fórmula:



También se describe en la presente, *entre otros*, un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en el que:

65

Cy¹ es fenilo, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, o piridazinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido por 1, 2, 3, ó 4 grupos seleccionados independientemente entre R³, R⁴, R⁵, y R⁶;

Y es N o CH;

R¹ es alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₇, cicloalquilo C₃₋₇-alquilo C₁₋₃, heterocicloalquilo de 4-7 miembros, heterocicloalquilo-alquilo C₁₋₃ de 4-7 miembros, fenilo, fenilo-alquilo C₁₋₃, heteroarilo de 5-6 miembros o heteroarilo-alquilo C₁₋₃ de 5-6 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente de fluoro, cloro, alquilo C₁₋₃, -OH, -O(alquilo C₁₋₃), -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₃), -N(alquilo C₁₋₃)₂, -C(=O)N(alquilo C₁₋₃)₂, -C(=O)NH(alquilo C₁₋₃), -C(=O)NH₂, -C(=O)O(alquilo C₁₋₃), -S(=O)₂(alquilo C₁₋₃), -S(=O)₂(cicloalquilo C₃₋₆), -C(=O)(cicloalquilo C₃₋₆), y -C(=O)(alquilo C₁₋₃);

R² es H o alquilo C₁₋₃; en el que dicho alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre, cloro, -OH, -O(alquilo C₁₋₃) fluoro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, NH₂, -NH(alquilo C₁₋₃), y -N(alquilo C₁₋₃)₂; o

R¹ y R², junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocicloalquilo de 4, 5 o 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados independientemente entre F, Cl, -OH, -O(alquilo C₁₋₃), -CN, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₃), -N(alquilo C₁₋₃)₂, -CH₂-CN, y -CH₂OH;

R³ es H, F, Cl, -CN, alquilo C₁₋₃, C₁₋₃, fluoroalquilo, -O(alquilo C₁₋₃), o -O(C₁₋₃ fluoroalquilo);

R⁴ es H, F, Cl, -CN, alquilo C₁₋₃, C₁₋₃, fluoroalquilo, -O(alquilo C₁₋₃), o -OC(C₁₋₃ fluoroalquilo);

R⁵ es H, F, Cl, -CN, alquilo C₁₋₃, C₁₋₃, fluoroalquilo, -O(alquilo C₁₋₃), o -OC(C₁₋₃ fluoroalquilo);

R⁶ es H, F, Cl, -CN, alquilo C₁₋₃, C₁₋₃, fluoroalquilo, -O(alquilo C₁₋₃), o -OC(C₁₋₃ fluoroalquilo);

R⁷ es H, F, Cl, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, -NR^{17a}R^{17b}, -NHC(=O) R^{17b}, -C(=O)NR^{17a}R^{17b}, -NHS(=O)₂R^{17b}, o -S(=O)₂NR^{17a}R^{17b}, en donde dicho alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados de F, Cl, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, OH, -OCH₃, y -OCF₃, -OCHF₂, y -OCH₂F;

R⁸ es H, F, Cl, alquilo C₁₋₃, o haloalquilo C₁₋₃;

R⁹ es H, F, Cl, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, ciclopropilo, -CN, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₃), o -N(alquilo C₁₋₃)₂, en donde dicho alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados de F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, y OH;

R¹⁰ es H, F, Cl, alquilo C₁₋₃, haloalquilo C₁₋₃, ciclopropilo, -CN, -NH₂, -NH(alquilo C₁₋₃), o -N(alquilo C₁₋₃)₂, en donde dicho alquilo C₁₋₃ está opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados de F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, y OH;

R¹⁷ es alquilo C₁₋₆, fenilo o heteroarilo de 5-6 miembros, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes independientemente seleccionados R²⁷;

R^{17a} es H o alquilo C₁₋₃;

R^{17b} es alquilo C₁₋₃ opcionalmente sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes seleccionados de F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, OH, -OCH₃, y -OCF₃, -OCHF₂, y -OCH₂F; y

cada R²⁷ se selecciona independientemente entre halo, -OH, NO₂, -CN, alquilo C₁₋₃, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, haloalquilo C₁₋₃, ciano-alquilo C₁₋₃, HO-alquilo C₁₋₃, hidroxialquilo CF₃-C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃-alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₇, alcoxi C₁₋₃, C₁₋₃ haloalcoxi, H₂N-, (alquilo C₁₋₃) NH-, (alquilo C₁₋₃)₂N-, HS-, alquilo C₁₋₃-S-, alquilo C₁₋₃-S(=O)-, alquilo C₁₋₃-S(=O)₂-, carbamilo, alquilcarbamilo C₁₋₃, di(alquilo C₁₋₃) carbamilo, carboxi, alquilo C₁₋₃-C(=O)-, alcoxi C₁₋₄ -C(=O)-, alquilo C₁₋₃-C(=O)O-, alquilo C₁₋₃-C(=O)NH-, alquilo C₁₋₃-S(=O)₂NH-, H₂N-SO₂ -, alquilo C₁₋₃-NH-S(=O)₂-, (alquilo C₁₋₃)₂NS(=O)₂-, H₂NS(=O)₂NH-, alquilo C₁₋₃-NHS(=O)₂NH-, (alquilo C₁₋₃)₂NS(=O)₂NH-, H₂NC(=O)NH-, alquilo C₁₋₃-NHC(=O)NH-, y (alquilo C₁₋₃)₂N-C(=O)NH-.

También se describe en la presente 4-[3-(cianometilo)-3-(3', 5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona una sal seleccionada de:

4-[3-(cianometilo)-3-(3', 5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)₂,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida sal de ácido fosfórico;

4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)₂,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida sal de ácido clorhídrico; 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)₂,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida bromhídrico sal de ácido; y 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)₂,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida sulfúrico sal de ácido.

En algunas realizaciones, la sal es 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N 2,5-difluoro-[(1S)₂,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida sal de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la sal es una relación estequiométrica 1:1 de 4-[3-(cianometilo)-3-(3', 5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetil]benzamida a ácido fosfórico. En algunas realizaciones, la sal es cristalina. En algunas realizaciones, la sal está sustancialmente aislada.

También se describe en la presente la sal 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido clorhídrico. En algunas realizaciones, la sal es una relación estequiométrica 1:1 de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida a ácido clorhídrico. En algunas realizaciones, la sal es cristalina. En algunas realizaciones, la sal está sustancialmente aislada.

[0087] También se describe en la presente la sal 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N 2,5-difluoro-[(1 S)2,2,2-trifluoro-1metiloetilo]benzamida sal de ácido sulfúrico. En algunas realizaciones, la sal es una relación estequiométrica 1:1 de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida a ácido sulfúrico. En algunas realizaciones, la sal es cristalina. En algunas realizaciones, la sal está sustancialmente aislada.

En algunas realizaciones, el ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida se caracteriza por un termograma DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 228°C. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 4A. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene al menos un pico de XRPD, en términos de 2-teta, seleccionado entre aproximadamente 6,8°, aproximadamente 16,5°, aproximadamente 19,8°, aproximadamente 20,7° y aproximadamente 23,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-teta, seleccionados entre aproximadamente 6,8°, aproximadamente 16,5°, aproximadamente 19,8°, aproximadamente 20,7° y aproximadamente 23,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-teta, seleccionados entre aproximadamente 6,8°, aproximadamente 16,5°, aproximadamente 19,8°, aproximadamente 20,7° y aproximadamente 23,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados entre aproximadamente 6,8°, aproximadamente 16,5°, aproximadamente 19,8°, aproximadamente 20,7° y aproximadamente 23,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido fosfórico tiene un perfil XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 4C.

En algunas realizaciones, el ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida se caracteriza por un termograma DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 213°C. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 5A. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene al menos un pico XRPD, en términos de 2-teta, seleccionado entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 12,1°, aproximadamente 13,7°, aproximadamente 14,8°, aproximadamente 15,5°, aproximadamente 16,6°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 19,7°, aproximadamente 20,4°, aproximadamente 20,8°, aproximadamente 23,9°, aproximadamente 24,7°, aproximadamente 25,1°, aproximadamente 25,7°, aproximadamente 27,4°, y aproximadamente 28,3°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 12,1°, aproximadamente 13,7°, aproximadamente 14,8°, aproximadamente 15,5°, aproximadamente 16,6°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 19,7°, aproximadamente 20,4°, aproximadamente 20,8°, aproximadamente 23,9°, aproximadamente 24,7°, aproximadamente 25,1°, aproximadamente 25,7°, aproximadamente 27,4°, y aproximadamente 28,3°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 12,1°, aproximadamente 13,7°, aproximadamente 14,8°, aproximadamente 15,5°, aproximadamente 16,6°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 19,7°, aproximadamente 20,4°, aproximadamente 20,8°, aproximadamente 23,9°, aproximadamente 24,7°, aproximadamente 25,1°, aproximadamente 25,7°, aproximadamente 27,4° y aproximadamente 28,3°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 12,1°, aproximadamente 13,7°, aproximadamente 14,8°, aproximadamente 15,5°, aproximadamente 16,6°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 19,7°, aproximadamente 20,4°, aproximadamente 20,8°, aproximadamente 23,9°, aproximadamente 24,7°, aproximadamente 25,1°, aproximadamente 25,7°, aproximadamente 27,4° y aproximadamente 28,3°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico tiene un perfil de XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 5C.

En algunas realizaciones, el ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido bromhídrico se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 203°C. En algunas realizaciones, la sal de ácido bromhídrico tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la **FIGURA 7A**. En algunas realizaciones, la sal de ácido bromhídrico tiene al menos un pico XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 14,4°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 20,2°, aproximadamente 21,1°, aproximadamente 22,8°, aproximadamente 23,5°, aproximadamente 24,9°, aproximadamente 26,6°, aproximadamente 27,1°, y aproximadamente 28,2°. En algunas realizaciones, la sal de ácido bromhídrico tiene menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 14,4°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 20,2°, aproximadamente 21,1°, aproximadamente 22,8°, aproximadamente 23,5°, aproximadamente 24,9°, aproximadamente 26,6°, aproximadamente 27,1°, y aproximadamente 28,2°. En algunas realizaciones, la sal de

ácido bromhídrico tiene menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 14,4°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 20,2°, aproximadamente 21,1°, aproximadamente 22,8°, aproximadamente 23,5°, aproximadamente 24,9°, aproximadamente 26,6°, aproximadamente 27,1°, y aproximadamente 28,2°. En algunas realizaciones, la sal de ácido bromhídrico tiene menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,0°, aproximadamente 14,4°, aproximadamente 17,1°, aproximadamente 20,2°, aproximadamente 21,1°, aproximadamente 22,8°, aproximadamente 23,5°, aproximadamente 24,9°, aproximadamente 26,6°, aproximadamente 27,1°, y aproximadamente 28,2°. En algunas realizaciones, la sal de ácido bromhídrico tiene un perfil de XRPD sustancialmente como se muestra en la FIGURA 7C.

En algunas realizaciones, el ácido 4-[3-(cianometilo)-3'(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido sulfúrico se caracteriza por un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 259°C. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico se caracteriza por un termograma de DSC que tenía tres picos endotérmicos a aproximadamente 136°C, aproximadamente 147°C, y aproximadamente 259°C. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene un termograma DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 8A. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene al menos un pico XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de entre aproximadamente 7,3°, aproximadamente 14,7°, aproximadamente 9,9°, aproximadamente 19,0°, aproximadamente 19,6°, aproximadamente 21,3°, y aproximadamente 24,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene al menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,3°, aproximadamente 14,7°, aproximadamente 9,9°, aproximadamente 19,0°, aproximadamente 19,6°, aproximadamente 21,3°, y aproximadamente 24,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene al menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente 7,3°, aproximadamente 14,7°, aproximadamente 9,9°, aproximadamente 19,0°, aproximadamente 19,6°, aproximadamente 21,3°, y aproximadamente 24,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene al menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de entre aproximadamente seleccionado de aproximadamente 7,3°, aproximadamente 14,7°, aproximadamente 9,9°, aproximadamente 19,0°, aproximadamente 19,6°, aproximadamente 21,3°, y aproximadamente 24,6°. En algunas realizaciones, la sal de ácido sulfúrico tiene un perfil de XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 8B.

Las diferentes formas cristalinas pueden tener diferentes redes cristalinas (por ejemplo, células de la unidad) y, por lo general como resultado, tienen diferentes propiedades físicas. Las diferentes formas de sales pueden ser identificadas por los métodos de caracterización de estado sólido, tal como por difracción de polvo de rayos X (XRPD). Otros métodos de caracterización tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), de sorción dinámica de vapor (DVS), y similares ayudan a identificar la forma, así como a determinar la estabilidad y el contenido de disolvente/agua.

Un patrón XRPD de reflexiones (picos) se considera típicamente una huella digital de una forma cristalina particular. Es bien sabido que las intensidades relativas de los picos de XRPD ampliamente pueden variar dependiendo de, *entre otras cosas*, la técnica de preparación de muestras, distribución de tamaño de cristal, diversos filtros utilizados, el procedimiento de montaje de la muestra, y el instrumento particular empleado. En algunos casos, los nuevos picos pueden ser observados o picos existentes pueden desaparecer, dependiendo del tipo de instrumento o de la configuración. Tal como se utiliza aquí, el término "pico" se refiere a un reflejo que tiene una altura relativa/intensidad de al menos aproximadamente 4% de la altura de pico/intensidad máxima. Por otra parte, la variación de instrumentos y otros factores pueden afectar a los valores 2-theta. Por lo tanto, asignaciones de picos, tales como las reportadas en el presente documento, puede variar de más o menos aproximadamente 0,2°(2-theta), y el término "sustancialmente" y "aproximadamente" tal como se utiliza en el contexto de XRPD en el presente documento se entiende que abarca las variaciones anteriormente mencionadas.

De la misma manera, las lecturas de temperatura en relación con DSC, TGA, u otros experimentos térmicos pueden variar aproximadamente $\pm 3^\circ\text{C}$ en función del instrumento, los ajustes particulares, la preparación de muestras, etc. Por consiguiente, una forma cristalina informada en el presente documento que tiene un termograma de DSC "sustancialmente" como se muestra en cualquiera de las FIGs. o el término "aproximadamente" se entiende para dar cabida a tal variación.

En algunas realizaciones, las sales descritas en el presente documento están aisladas sustancialmente. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto es al menos parcialmente o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en las sales descritas en el presente documento. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 99% en peso de las sales descritas en el presente documento, o sal del mismo. Los métodos para aislar los compuestos y sus sales son de rutina en la técnica.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de

realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización (mientras que las formas de realización están destinadas a ser combinadas como si estuvieran escritas en multiplicar forma dependiente). A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

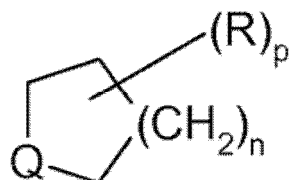
En varios lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de los compuestos de la invención se describen en grupos o en rangos. Se pretende específicamente que la invención incluya todas y cada subcombinación individual de los miembros de tales grupos y rangos. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₆" pretende específicamente dar a conocer individualmente metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅, y alquilo C₆.

En varios lugares de la presente memoria descriptiva, se describen sustituyentes de enlace. Cuando la estructura claramente requiere un grupo de unión, las variables de Markush enumeradas para ese grupo se entienden como grupos de unión. Por ejemplo, si la estructura requiere un grupo de unión y la definición del grupo Markush para esa variable enumera "alquilo" o "arilo", entonces es de entenderse que el "alquilo" o "arilo" representa un grupo grupo alquileno o arileno que une, respectivamente.

En varios lugares de la presente memoria descriptiva, se describen anillos (por ejemplo, "un anillo de piperidina"). A menos que se especifique lo contrario, estos anillos pueden estar unidos al resto de la molécula en cualquier miembro de anillo según lo permita la valencia. Por ejemplo, el término "un anillo de 2H-tetrahidropiran" puede referirse a un anillo 2H-tetrahidropiran, -2-ilo, 2H-tetrahidropirano, -3-ilo, 2H-tetrahidropiran-4-ilo, etc.

El término "n-miembros", donde n es un entero típicamente describe el número de átomos que forman el anillo en un resto en el que el número de átomos que forman el anillo es n. Por ejemplo, 2H-tetrahidropiran es un ejemplo de un anillo de hetrocicloalquilo de 6 miembros, 1H-1,2,4-triazol es un ejemplo de un anillo de heteroarilo de 5 miembros, piridina es un ejemplo de un anillo de heteroarilo de 6 miembros y 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno es un ejemplo de un grupo de cicloalquilo 10 miembros.

Para los compuestos de la invención en la que una variable aparece más de una vez, cada variable puede ser un resto diferente seleccionado independientemente del grupo que define la variable. Por ejemplo, donde se describe una estructura que tiene dos grupos R que están presentes simultáneamente en el mismo compuesto, los dos grupos R pueden representar diferentes restos seleccionados independientemente entre el grupo definido para R. En otro ejemplo, cuando un sustituyente opcionalmente múltiple se designa en la forma:



entonces es de entenderse que el sustituyente R puede ocurrir un número p de veces en el anillo, y R puede ser un resto diferente en cada aparición. Es de entenderse que cada grupo R puede reemplazar cualquier átomo de hidrógeno unido a un átomo del anillo, incluyendo uno o ambos de los átomos de hidrógeno (CH₂)_n. Además, en el ejemplo anterior, se debe definir la variable Q para incluir hidrógenos, como cuando Q se dice que es CH₂, NH, etc., cualquier sustituyente flotante tal como R en el ejemplo anterior, puede sustituir un hidrógeno de la variable de Q, así como un hidrógeno en cualquier otro componente no variable del anillo.

Tal como se utiliza aquí, la frase "opcionalmente sustituido" significa no sustituido o sustituido. Tal como se utiliza aquí, el término "sustituido" significa que un átomo de hidrógeno se retira y se sustituye por un sustituyente. Es de entenderse que la sustitución en un átomo dado está limitado por la valencia.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquilo C_{n-m}", usado sólo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada, que tiene átomos de carbono n a m. En algunas realizaciones, el grupo alquilo contiene de 1 a 6, 1 a 4 o de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de restos alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos químicos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec -butilo, *tert* -butilo, n -pentilo, 2-metilo-1-butilo, 3-pentilo, n -hexilo, 1,2,2-trimetilopropilo, y similares.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquileno", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo alquilo divalente de unión, que puede ser ramificado o de cadena lineal, donde los dos sustituyentes pueden estar unidos en cualquier posición del grupo de unión a alquileno. Ejemplos de grupos alquileno incluyen, pero no se limitan a, etan-1,2-diilo, propan-1,3-diilo, propan-1,2-diilo, y similares.

Como se usa en el presente documento, " C_{n-m} alqueno" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tiene átomos de carbono n a m . En algunas realizaciones, el resto alqueno contiene de 2 a 3 átomos de carbono. Grupos de alqueno de ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etenilo, *n*-propenilo, isopropenilo, *n*-butenilo, *sec*-butenilo, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "alquino C_{n-m} " se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono y que tiene átomos de carbono n a m . Los ejemplos de grupos alquino incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo, y similares. En algunas realizaciones, el resto alquino contiene de 2 a 3 átomos de carbono.

Tal como se utiliza aquí, el término "alcoxi C_{1-3} ", usado sólo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de fórmula -O-alquilo, en el que el grupo alquilo tiene de 1 a 3 carbonos. Grupos alcoxi ejemplares incluyen metoxi, etoxi, y propoxi (por ejemplo, *n*-propoxi e isopropoxi).

Tal como se utiliza aquí, el término " CF_3 - C_{1-3} hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo C_{1-3} sustituido por un grupo CF_3 y un grupo OH.

Los grupos C_{1-3} en (alquilo C_{1-3}) $_2$ N-, (alquilo C_{1-3}) $_2$ NS(=O) $_2$ NH-, y (alquilo C_{1-3}) $_2$ NC(=O)NH- pueden ser iguales o diferentes.

Tal como se utiliza aquí, el término "carboxi" se refiere a un grupo de fórmula -C(=O)OH.

Tal como se utiliza aquí, el término "carbamilo" se refiere a un grupo de fórmula -C(=O)-NH $_2$.

Tal como se utiliza aquí, el término "alquilcarbamilo C_{1-3} " se refiere a un grupo de fórmula -C(=O)-NH(alquilo), en el que el grupo de alquilo tiene 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se utiliza aquí, el término "di(alquilo C_{1-3}) carbamilo" se refiere a un grupo de fórmula -C(=O)N(alquilo) $_2$, en el que los dos grupos alquilo tienen cada uno, independientemente, 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se utiliza aquí, el término "HO- C_{n-m} alquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alqueno-OH, en donde dicho grupo alqueno tiene de átomos de carbono n a m . En algunas realizaciones, el grupo alqueno tiene de 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se utiliza aquí, el término "alcoxi C_{o-p} -alquilo C_{n-m} " se refiere a un grupo de fórmula -alqueno-O-alquilo, en donde dicho grupo alqueno tiene de átomos de carbono n a m y dicho grupo alquilo tiene o a p átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alquilo y alqueno tienen cada uno independientemente 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se usa en el presente documento, "halo" o "halógeno", empleado solo o en combinación con otros términos, incluye fluoro, cloro, bromo, y yodo. En algunas realizaciones, el grupo halo es fluoro o cloro.

Tal como se utiliza aquí, el término "haloalquilo C_{n-m} ", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo de alquilo C_{n-m} que tiene hasta $\{2(n + m) + 1\}$ átomos de halógeno que pueden ser o bien iguales o diferentes. En algunas realizaciones, los átomos de halógeno son átomos de flúor. En algunas realizaciones, el grupo alquilo tiene 1-6 o 1-3 átomos de carbono. Grupos de haloalquilo ejemplares incluyen CF_3 , C_2F_5 , CHF_2 , CCl_3 , $CHCl_2$, C_2Cl_5 , y similares. En algunas realizaciones, el grupo haloalquilo es un grupo fluoroalquilo.

Tal como se utiliza aquí, el término "fluoroalquilo C_{1-3} " se refiere a un grupo alquilo C_{1-3} que puede estar parcial o completamente sustituido por átomos de flúor.

Tal como se usa en el presente documento, "haloalcoxi C_{n-m} " se refiere a un grupo de fórmula -O-haloalquilo que tiene átomos de carbono n a m . Un grupo haloalcoxi ejemplar es OCF_3 . En algunas realizaciones, el grupo haloalcoxi es fluorado solamente. En algunas formas de realización, el grupo alquilo tiene 1 a 6 o de 1 a 4 átomos de carbono.

Tal como se utiliza aquí, el término "ciano- C_{n-m} alquilo" se refiere a un alquilo C_{n-m} sustituido por un grupo ciano. En algunas realizaciones, el grupo alquilo tiene 1 a 3 átomos de carbono.

Tal como se usa en este documento, la aparición del término "monocíclico" antes del nombre de que un resto indica que la fracción tiene un solo anillo.

Tal como se utiliza aquí, el término "feniloalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alqueno-fenilo. En algunas realizaciones, feniloalquilo es fenilo-alquilo C_{1-3} .

Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto hidrocarburo no aromático cíclico, que puede contener opcionalmente uno o más grupos alquilenilo como parte de la estructura del anillo. Los grupos cicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos mono- o policíclicos (por ejemplo, que tiene de 2, 3 o 4 anillos fusionados, espirrocíclicos, o puenteados). También se incluyen en la definición de cicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, que tiene un enlace en común con) al anillo cicloalquilo, por ejemplo, derivados de benzo de ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, y similares. Uno o más átomos de carbono que forman el anillo de un grupo cicloalquilo pueden ser oxidados para formar enlaces de carbonilo. En algunas realizaciones, cicloalquilo es un cicloalquilo de 3-7 miembros, que es monocíclico o bicíclico. En algunas realizaciones, cicloalquilo es un cicloalquilo monocíclico de 3-6 o 3-7. Grupos de cicloalquilo ejemplar incluyen naftaleno 1,2,3,4-tetrahidro-, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo, y similares. En algunas realizaciones, el grupo cicloalquilo es ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, o ciclohexilo.

Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquiloenecicloalquilo. En algunas realizaciones, cicloalquilalquilo es cicloalquilo C₃₋₇-alquilo C₁₋₃, donde la porción de cicloalquilo es monocíclica.

Tal como se utiliza aquí, el término "heteroarilo", usado sólo o en combinación con otros términos, se refiere a un resto de hidrocarburo aromático monocíclico o policíclico (por ejemplo, que tienen 2, 3 o 4 anillos fusionados), que tiene uno o más miembros de anillo heteroátomo seleccionados de nitrógeno, azufre y oxígeno. En algunas realizaciones, el heteroarilo es un heteroarilo de 5-6 miembros, que es monocíclico o bicíclico, que comprende de 1 a 5 átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 miembros del anillo de heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Cuando el grupo heteroarilo contiene más de un miembro del anillo heteroátomo, los heteroátomos pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos de grupos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, pirrol, pirazol, azolilo, oxazol, tiazol, imidazol, furano, tiofeno, o similares.

Un heteroarilo de cinco miembros de anillo es un heteroarilo con un anillo que tiene cinco átomos en el anillo en el que uno o más (por ejemplo, 1, 2, o 3) átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O, y S. Los ejemplos de cinco miembros heteroarilos de anillo son tienilo, furilo, pirrolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, 1,2,3-triazolilo, tetrazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-triazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, y 1,3,4-oxadiazolilo.

Un heteroarilo de anillo de seis miembros es un heteroarilo con un anillo que tiene seis átomos de anillo en el que uno o más (por ejemplo, 1, 2, o 3) átomos de anillo se seleccionan independientemente de N, O, y S. Los ejemplos de seis miembros heteroarilos de anillo son piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, triazinilo y piridazinilo.

Tal como se utiliza aquí, el término "heteroarilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquilenilo-heteroarilo. En algunas formas de realización, heteroarilalquilo es heteroarilo-alquilo C₁₋₃ de 5-6 miembros, en el que la porción de heteroarilo es monocíclica, que comprende de 1 a 5 átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 miembros del anillo de heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, azufre y oxígeno.

Tal como se utiliza aquí, el término "heterocicloalquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere al sistema de anillo aromático, que puede contener opcionalmente uno o más grupos alquilenilo o alquinileno como parte de la estructura del anillo, y que tiene al menos un miembro del anillo heteroátomo seleccionado independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Cuando los grupos heterocicloalquilo contienen más de un heteroátomo, los heteroátomos pueden ser iguales o diferentes. Los grupos heterocicloalquilo pueden incluir sistemas de anillos mono- o policíclicos (por ejemplo, que tiene de 2, 3 o 4 anillos fusionados, espirrocíclicos, o puenteados). También se incluye en la definición de heterocicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, que tiene un enlace en común con) al anillo no aromático, por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-quinolina y similares. Los átomos de carbono o heteroátomos en el anillo del grupo heterocicloalquilo pueden ser oxidados para formar un carbonilo, o un grupo sulfonilo (u otro enlace oxidado) o un átomo de nitrógeno se pueden cuaternizar. En algunas formas de realización, heterocicloalquilo es heterocicloalquilo de 4-7 miembros, que es monocíclico, que comprende 2-6 átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 miembros del anillo de heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen azetidina, azepan, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, pirano, y un anillo de 2-oxo-1,3-oxazolidina.

Tal como se utiliza aquí, el término "heterocicloalquilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquilenilo-heterocicloalquilo. En algunas realizaciones, heterocicloalquilalquilo es heterocicloalquilo-C₁₋₃ alquilo de 4-7 miembros, en donde la parte de heterocicloalquilo es monocíclico, que comprende 2-6 átomos de carbono y 1, 2, 3, o 4 miembros del anillo de heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno.

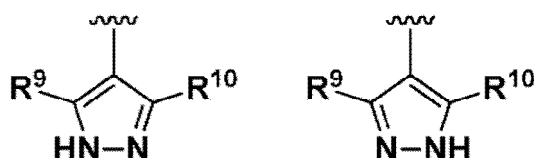
Los compuestos descritos en este documento pueden ser asimétricos (por ejemplo, que tienen uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, se entienden a no ser que

se indique lo contrario. Los compuestos de la presente invención que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Métodos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente inactivos son conocidos en la técnica, tal como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, C = N dobles enlaces, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en el presente documento, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente invención. Isómeros geométricos *cis* y *trans* de los compuestos de la presente invención se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

La resolución de mezclas racémicas de compuestos puede realizarse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método de ejemplo incluye recristalización fraccional utilizando un ácido de resolución quiral, que es un ácido orgánico ópticamente activo, formador de sal. Agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos, tales como β-ácido alcanforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada incluyen formas estereoisoméricamente puras de α-metilbencilamina (*por ejemplo*, formas *S* y *R*, o formas diastereoméricamente puras), 2-feniloglicinol, norefedrina, efedrina, N-metilofedrina, ciclohexiletamina, 1,2- diaminociclohexano, y similares.

La resolución de mezclas racémicas también puede llevarse a cabo por elución en una columna rellena con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfeniloglicina). La composición de disolvente de elución adecuada puede determinarse por un experto en la técnica.

Los compuestos de la invención también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas resultan de la permutación de un enlace sencillo con un doble enlace adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isoméricos que tienen la misma fórmula empírica y la carga total. Tautómeros prototrópicos ejemplares incluyen pares cetona-enol, pares amida-ácidos imídicos, pares lactama-lactima, pares enamina-imina, y formas anulares donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H-1,2,4-triazol, 1H- y 2H-isoindol, y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o estéricamente bloqueadas en una forma por sustitución apropiada. Por ejemplo, se reconocerá que el siguiente anillo de pirazol puede formar dos tautómeros:



Se pretende que las reivindicaciones abarcan los dos tautómeros.

Los compuestos de la invención también pueden incluir todos los isótopos de átomos que aparecen en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. En algunas realizaciones, 1, 2, o 3 grupos CH₂ en el anillo de azetidina de fórmula I se sustituye por un grupo CHD o CD₂. En algunas realizaciones, 1, 2, o 3 grupos CH₂ o CH en el anillo de piperidina de fórmula I se sustituye por un grupo CHD, CD₂ o CD, respectivamente. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, o 5 grupos CH₂ o CH en el anillo de piperidina de fórmula I se sustituyen por un grupo CHD, CD₂ o CD, respectivamente.

El término "compuesto", como se usa aquí se entiende que incluye todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, y los isótopos de las estructuras representadas. Además, los compuestos en el presente documento identifican por el nombre o la estructura como una forma tautómera particular, tienen la intención de incluir otras formas tautoméricas a menos que se especifique lo contrario.

Todos los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, se pueden encontrar, junto con otras sustancias tales como agua y disolventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o pueden ser aislados.

En algunas realizaciones, los compuestos de la invención, o sales de los mismos, están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto es al menos parcialmente o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en los compuestos de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%,

al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 99% en peso de los compuestos de la invención, o sal de los mismos. Los métodos para aislar los compuestos y sus sales son de rutina en la técnica.

5 La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

10 Las expresiones "temperatura ambiente" y "temperatura ambiente", como se usa en este documento, se entienden en la técnica, y se refieren en general a una temperatura, por ejemplo una temperatura de reacción, es decir sobre la temperatura de la habitación en la que la reacción se lleva a cabo, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C.

15 También se divulgan sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente. Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a los derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto parental se modifica mediante la conversión de un ácido existente o resto de base a su forma de sal. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de ácidos minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen las sales no tóxicas del compuesto original formadas, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contienen un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar por reacción de las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol, iso-propanol, o butanol) o acetonitrilo (ACN). Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977). En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente invención incluyen las formas de N-óxido.

Síntesis

35 Los compuestos de la invención, incluyendo sales de los mismos, se pueden preparar usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden ser sintetizados de acuerdo con cualquiera de las numerosas rutas sintéticas posibles, tales como aquellas en los esquemas a continuación. Las reacciones para preparar compuestos de la invención pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos a las temperaturas a las que las reacciones se llevan a cabo, por ejemplo, temperaturas que pueden oscilar desde la temperatura de congelación del disolvente a la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, los disolventes adecuados para una etapa de reacción particular pueden seleccionarse por el experto en la materia.

45 La preparación de compuestos de la invención puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados, se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 4^a ed, John Wiley & Sons: Nueva Jersey., (2007).

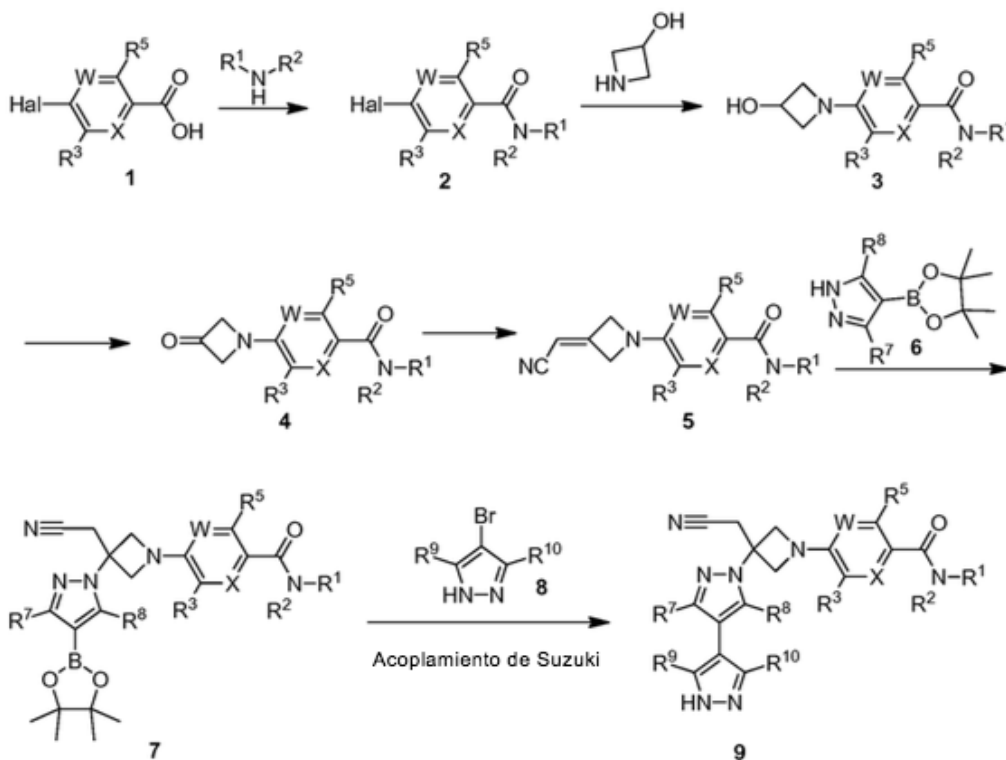
50 Las reacciones pueden ser controladas de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de producto puede controlarse por medios espectroscópicos, tales como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ¹H o ¹³C), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), espectrometría de masas, o por métodos cromatográficos tales como alta cromatografía líquida (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC).

60 Los compuestos de Fórmula I pueden ser sintetizados por procedimientos análogos a los de los esquemas a continuación. Una serie de derivados de bipirazol **9** se puede preparar de acuerdo con los métodos esbozados en el Esquema 1. Un ácido aromático **1** puede ser convenientemente convierte en la amida correspondiente **2** utilizando el reactivo de acoplamiento de amida tal como BOP, PYOP, HATU, HBTU, EDC o CDI. La sustitución del grupo saliente Hal (Hal puede ser halógeno, OTs o OTf) en **2** por 3-hidroxiazetidina para producir el compuesto **3** puede lograrse en condiciones térmicas en un disolvente adecuado tal como, pero no limitado a, DMSO, dioxano, DMF, o NMP en presencia de una base tal como carbonato de potasio, carbonato de cesio, o carbonato de sodio; o bajo condiciones de reacción de *N*-arilación de tipo Ullmann catalizadas por cobre mediante el uso de yoduro de cobre (I) y carbonato de potasio; o bajo condiciones de reacción de enlace C-N catalizado por paladio utilizando xanthpos,

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

BINAP, o P(o-Tol)₃ como el carbonato de ligando y de potasio o carbonato de cesio como la base. α,β-nitrilo insaturado **5** puede obtenerse a través de la reacción de Wittig de cianometilfosfonato de dietilo con la cetona **4** que se puede preparar por oxidación de Swern de **3**. La adición de Michael de **6** con α,β-nitrilo insaturado **5** puede permitirse el éster borónico **7**. El acoplamiento de Suzuki del éster borónico **7** con un haluro de pirazol adecuado **8** puede permitirse el correspondiente derivado de bipirazol **9**.

Esquema 1



40
 45
 50
 55
 60
 65

Una serie de derivados de éster borónico **7** pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos esbozados en el Esquema 2. Adición de Michael de **6** con α,β-nitrilo insaturado **10** puede permitirse el éster borónico **11**. La eliminación del grupo Boc se puede lograr en condiciones ácidas para proporcionar la amina correspondiente **12**. La sustitución del grupo saliente Hal en **12** por **13** puede producir el éster borónico **7** en condiciones térmicas en un disolvente adecuado tal como, pero no limitado a, acetonitrilo, DMSO, dioxano, DMF, o NMP en presencia de una base tal como potasio carbonato, carbonato de cesio, carbonato de sodio, base de Hunig o DBU.

Esquema 2

5

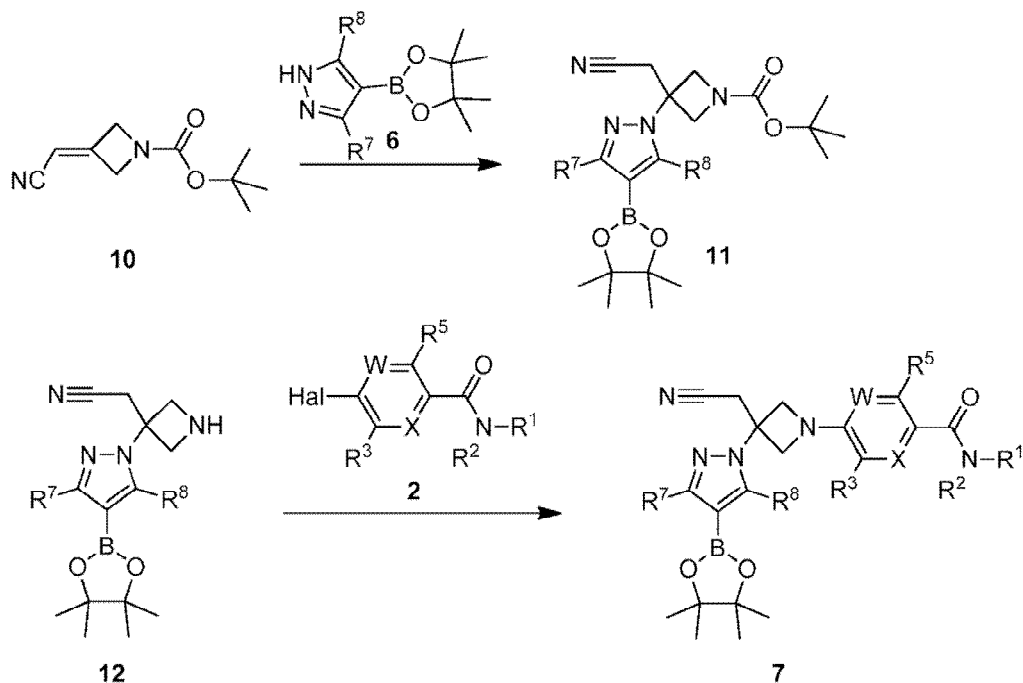
10

15

20

25

30



35

40

45

50

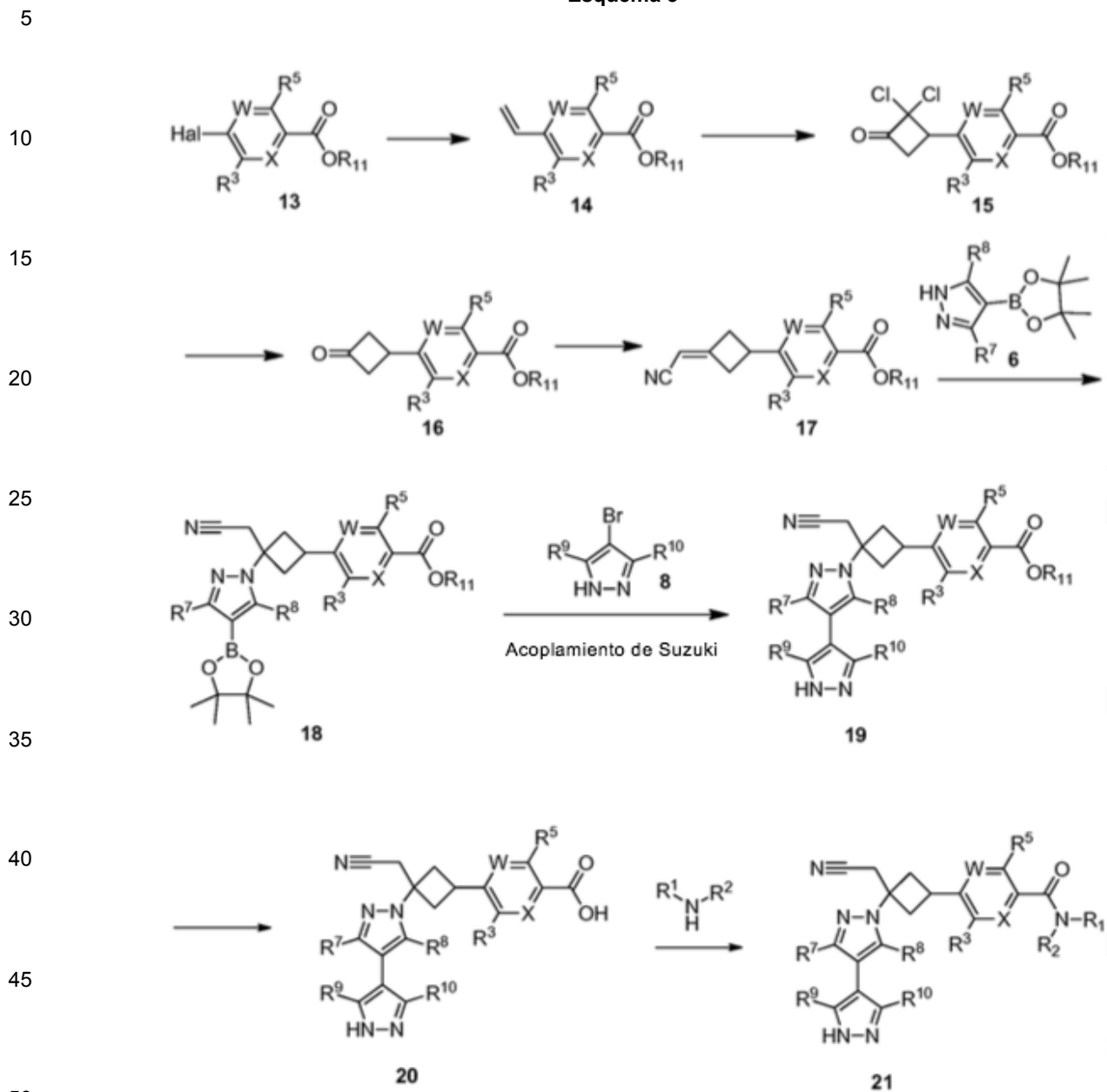
55

60

65

Una serie de derivados de bipirazol **21** puede prepararse de acuerdo con los métodos esbozados en el Esquema 3. Ésteres halo-aromáticos **13** pueden ser convertidos a los correspondientes alquenos **14** por acoplamiento de Suzuki de los ésteres halo-aromáticos **13**. Con ésteres borónicos de vinilo. Alquenos **14** pueden hacerse reaccionar con cetonas apropiadamente sustituidas (tales como dicloroqueteno) de 2+2 cicloadiciones para dar los diclorociclobutanonas **15**. Bajo condiciones reductoras (tales como zinc en ácido acético en condiciones térmicas) los diclorociclobutanonas **15** se pueden convertir en ciclobutanonas **16**. α,β -nitrilos insaturados **17** pueden formarse por reacción de las ciclobutanonas **16** con el reactivo de Horner-Wadsworth-Emmons. Ésteres borónicos **6** pueden hacerse reaccionar con α,β -nitrilos saturados **17** en condiciones de adición Michael, en presencia de agentes de acoplamiento para dar los compuestos **18**. El acoplamiento de Suzuki de los ésteres borónicos **18** con haluros de pirazol adecuados **8** puede permitirse los correspondientes bipirazoles **19**. La hidrólisis de ésteres de **19** en condiciones básicas puede dar los ácidos **20**. Las amidas **21** pueden sintetizarse por acoplamiento de los ácidos **20** con aminas apropiadamente sustituidas utilizando reactivos de acoplamiento de amida tales como BOP, PyBop, HATU, HBTU, EDC o CDI.

Esquema 3



Procesos

55 La presente solicitud proporciona un proceso de formación de las sales descritas en el presente documento que comprende hacer reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-*N*-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiletilo]benzamida con un ácido seleccionado de ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, y ácido sulfúrico para formar la sal del mismo. En algunas realizaciones, el procedimiento utiliza de aproximadamente 0,55 a 1,5 equivalentes del ácido por equivalente de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-*N*-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida.

60 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende hacer reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-*N*-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida con ácido fosfórico en un componente disolvente a una temperatura superior a la temperatura ambiente para formar sal de ácido fosfórico de ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-*N*-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente 40°C

65

a aproximadamente 70°C. En algunas realizaciones, la temperatura es aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende etanol. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende acetonitrilo. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende isopropanol. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende metanol. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende metanol e isopropanol. En algunas realizaciones, el componente disolvente comprende metanol, isopropanol, y n-heptano. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además enfriar la mezcla a temperatura ambiente y filtrado para aislar la sal. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la eliminación de una parte del disolvente para formar una mezcla concentrada antes de dicho filtrado. En algunas realizaciones, una porción del disolvente se elimina por destilación.

La presente solicitud proporciona además un proceso de formación de 4-[(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico, ing compris- reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida con ácido fosfórico en un componente disolvente que comprende metanol y de isopropanol a una temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C formar una mezcla que comprende la sal de ácido fosfórico de ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la adición de n-heptano a la mezcla a una temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C para formar una segunda mezcla. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 50°C.

En alguna realización, la presente solicitud proporciona además un procedimiento de preparación de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico, que comprende:

- (a) disolución del ácido 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico en metanol a una temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C para formar una primera mezcla;
- (b) la adición de n-heptano a la primera mezcla a una temperatura de aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C para formar una segunda mezcla; y
- (c) enfriar la segunda mezcla para proporcionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico.

En algunas realizaciones, el proceso de la realización anterior comprende además la destilación de al menos una parte del metanol a partir de la primera mezcla antes de la etapa (b). En algunas realizaciones, el proceso de la anterior forma de realización comprende además la destilación de al menos una parte del metanol y/o n-heptano de la segunda mezcla antes de la etapa (c). En algunas realizaciones, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C. En algunas realizaciones, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 50°C.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende hacer reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida con ácido clorhídrico en un componente de disolvente de ventilación a una temperatura por encima de la temperatura ambiente hasta formar la sal de ácido clorhídrico de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura a aproximadamente temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende 2-butanol. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol y acetato de isopropilo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el filtrado para aislar la sal. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el lavado de la sal aislada con metilo *terc*-butilo éter.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende hacer reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida con ácido bromhídrico en un componente de disolvente a una temperatura por encima de la temperatura ambiente hasta formar la sal de ácido bromhídrico de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura a aproximadamente temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol y agua. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el filtrado para aislar la sal. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el lavado de la sal aislada con metilo *terc*-butilo éter.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende hacer reaccionar 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida con ácido sulfúrico en un componente de disolvente para formar la sal de ácido sulfúrico de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-

1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el filtrado para aislar la sal. En algunas realizaciones, la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 60°C. En algunas realizaciones, el componente de disolvente comprende isopropanol y agua. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además enfriar la mezcla a temperatura ambiente y filtrado para aislar la sal. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el lavado de la sal aislada con metilo *terc*-butilo éter.

10 Métodos

Los compuestos de la invención son inhibidores de JAK, y la mayoría de los compuestos de la invención, son inhibidores selectivos de la JAK1. Un inhibidor selectivo de JAK1 es un compuesto que inhibe la actividad de JAK1 preferentemente sobre otras quinasas Janus. Por ejemplo, los compuestos de la invención inhiben preferentemente JAK1 sobre uno o más de JAK2, JAK3, y TYK2. En algunas realizaciones, los compuestos inhiben JAK1 preferentemente sobre JAK2 (por ejemplo, tienen una relación de JAK1/JAK2 $CI_{50} > 1$). En algunas realizaciones, los compuestos son aproximadamente 10 veces más selectivos para JAK1 sobre JAK2. En algunas realizaciones, los compuestos son aproximadamente 3 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, o aproximadamente 20 veces más selectivos para JAK1 sobre JAK2 como se calcula mediante la medición de CI_{50} en mM ATP (por ejemplo, véase el Ejemplo A).

JAK1 juega un papel central en una serie de citocinas y factor de crecimiento vías que, cuando se desregulan, pueden resultar en o contribuir a estados de enfermedad de señalización. Por ejemplo, los niveles IL-6 están elevados en la artritis reumatoide, una enfermedad en la que se ha sugerido que tiene efectos perjudiciales (Fonesca, JE et al., *Autoimmunity Reviews*, 8: 538-42, 2009). Debido a que señales IL-6, al menos en parte, a través de JAK1, antagonizan IL-6 directamente o indirectamente a través de la inhibición JAK1, se espera que proporcione un beneficio clínico (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14: 1421, 1995; Smolen., JS, et al *Lancet* 371: 987, 2008). Además, en algunos tipos de cáncer JAK1 está mutado resulta en el crecimiento de células tumorales indeseables constitutivas y la supervivencia (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*106: 9414-8, 2009; Flex E., et al. *J Exp Med* 205: 751-8, 2008). En otras enfermedades autoinmunes y cánceres, elevados niveles sistémicos de citoquinas inflamatorias que activan JAK1 también pueden contribuir a la enfermedad y/o los síntomas asociados. Por lo tanto, los pacientes con tales enfermedades pueden beneficiarse de la inhibición JAK1. Los inhibidores selectivos de JAK1 pueden ser eficaces evitando al mismo tiempo los efectos innecesarios y potencialmente indeseables de la inhibición de otras quinasas JAK.

Los inhibidores selectivos de JAK1, en relación con otras quinasas JAK, pueden tener múltiples ventajas terapéuticas más inhibidores menos selectivos. Con respecto a la selectividad frente a JAK2, un número de citoquinas y factores de crecimiento importantes de la señal a través de JAK2 incluyendo, por ejemplo, la eritropoyetina (Epo) y trombopoyetina (TPO) (Parganas E, et al *Cell* 93: 385-95, 1998). Epo es un factor de crecimiento clave para la producción de células rojas de la sangre; por lo tanto, una escasez de la señalización dependiente de EPO puede resultar en un número reducido de glóbulos rojos y anemia (Kaushansky K, *NEJM* 354: 2034-45, 2006). Tpo, otro ejemplo de un factor de crecimiento dependiente de JAK2, desempeña un papel central en el control de la proliferación y maduración de los megacariocitos - las células de las que se producen plaquetas (Kaushansky K, *NEJM* 354: 2034-45, 2006). Como tal, señalización de Tpo reducida disminuiría números de megacariocitos (megacariocitopenia) y recuentos de plaquetas circulantes inferiores (trombocitopenia). Esto puede resultar en hemorragia indeseable y/o incontrolable. Inhibición reducida de otros JAK, tales como JAK3 y Tyk2, también puede ser deseable ya que seres humanos que carecen de la versión funcional de estas quinasas se han demostrado sufrir de numerosas enfermedades tales como la inmunodeficiencia severa combinada o síndrome de hiperinmunoglobulinemia E (Minegishi, Y, et al. *Inmunidad*25: 745-55, 2006; Macchi P, et al *Nature* 377: 65-8, 1995). Por lo tanto un inhibidor de la JAK1 con afinidad reducida para otros JAK tendría ventajas significativas sobre un inhibidor menos selectivo con respecto a los efectos secundarios reducidos que implican la supresión inmunitaria, anemia y trombocitopenia.

Los compuestos descritos en la presente pueden usarse en métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con JAK en un individuo (por ejemplo, paciente) mediante la administración al individuo en necesidad de dicho tratamiento de una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo. Una enfermedad asociada con JAK puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que está directa o indirectamente ligada a la expresión o actividad de la JAK, incluyendo la sobreexpresión y/o los niveles de actividad anormales. Una enfermedad asociada con JAK también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que se puede prevenir, mejorado, o se cura mediante la modulación de la actividad de JAK.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades que implican el sistema inmune incluyendo, por ejemplo, rechazo de trasplantes de órganos (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad injerto contra huésped).

Otros ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, diabetes de tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, nefropatías de inmunoglobulina, miocarditis, trastornos autoinmunes del tiroides, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune es un trastorno de la piel ampollosa autoinmune tal como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide ampolloso (PA).

Otros ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen las condiciones alérgicas tales como el asma, las alergias alimentarias, dermatitis eczematosa, dermatitis de contacto, dermatitis atópica (eczema atópico), y rinitis. Otros ejemplos de enfermedades asociadas a JAK incluyen enfermedades virales tales como virus de Epstein Barr (EBV), Hepatitis B, Hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus varicela-zóster (VZV) y virus del papiloma humano (VPH).

Otros ejemplos de enfermedad asociada con JAK incluyen enfermedades asociadas con la rotación de cartílago, por ejemplo, artritis gotosa, séptico o artritis infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome Tietze, atropatía costal, osteoartritis endémica deformante, enfermedad Mseleni, enfermedad Handigodu, degeneración que resulta de fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, o espondilitis anquilosante.

Otros ejemplos de enfermedad asociada con JAK incluyen malformaciones congénitas del cartílago, incluyendo crondrolisis hereditaria, crondrodisplasias, y pseudocrondrodisplasias (por ejemplo, microtia, enotia, y crondrodisplasia metafisaria).

Otros ejemplos de enfermedades o condiciones asociadas a JAK incluyen trastornos de la piel tales como la psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgaris), dermatitis atópica, erupción de la piel, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto o dermatitis alérgica de contacto). Por ejemplo, ciertas sustancias que incluyen algunos productos farmacéuticos cuando se aplica tópicamente puede causar sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, la coadministración o la administración secuencial de al menos un inhibidor de JAK de la invención junto con el agente que causa la sensibilización no deseada puede ser útil en el tratamiento de tal sensibilización no deseada o dermatitis. En algunas realizaciones, el trastorno de la piel es tratado por la administración tópica de al menos un inhibidor de JAK de la invención.

En realizaciones adicionales, la enfermedad asociada con JAK es cáncer, incluyendo los caracterizados por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de la cabeza y el cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, leiomiocarcinoma uterino, melanoma, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia, como la leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (AML) o mieloma múltiple), y cáncer de piel tales como el linfoma cutáneo de células T (CTCL) y linfoma de células B cutáneo. Ejemplo CTCLS incluyen el síndrome Sezary y micosis fungoide.

En algunas realizaciones, los inhibidores de JAK descritos en el presente documento, o en combinación con otros inhibidores de JAK, tales como los reportados en los Estados Unidos Nº de Ser. 11/637.545, puede usarse para tratar cánceres asociados con la inflamación. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con enfermedad inflamatoria intestinal. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, el cáncer asociado con la inflamación es el cáncer de colitis asociada. En algunas realizaciones, el cáncer asociado con la inflamación es el cáncer de colon o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), adenocarcinoma, cáncer de intestino delgado, o cáncer rectal.

Enfermedades asociadas con JAK pueden incluir además las caracterizadas por expresión de: mutantes JAK2 tales como los que tienen al menos una mutación en el dominio pseudo-quinasa (por ejemplo, JAK2V617F); mutantes JAK2 que tienen al menos una mutación fuera del dominio pseudo-quinasa; mutantes JAK1; mutantes de JAK3; mutantes de receptor de eritropoyetina (EPOR); o expresión desregulada de CRLF2.

Enfermedades asociadas con JAK pueden incluir además trastornos mieloproliferativos (TMP), tales como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosis primaria (PMF), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), síndrome hipereosinofílico (HES), la enfermedad de mastocitos sistémica (SMCD), y similares. En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis (por ejemplo, mielofibrosis primaria (PMF) o mielofibrosis trombocitemia vera/esencial post policitemia (Post-PV/ET MF)). En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es trombocitemia mielofibrosis post-esencial (Post-ET MF). En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis vera post policitemia (PV Post-MF).

En algunas realizaciones, los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse adicionalmente para tratar el síndrome mielodisplásico (MDS) en un paciente en necesidad del mismo. En algunas formas de realización, dicho paciente es la transfusión de eritrocitos dependiente.

5 Como se usa en el presente documento, los síndromes mielodisplásicos pretenden abarcar trastornos hematopoyéticos heterogéneos y clonales que se caracterizan por la hematopoyesis ineficaz en uno o más de los principales linajes de células mieloides. Los síndromes mielodisplásicos se asocian con insuficiencia de la médula ósea, las citopenias de sangre periférica, y una propensión a progresar a leucemia mieloide aguda (AML). Además, anormalidades citogenéticas clonales se pueden detectar en aproximadamente el 50% de los casos con MDS. En 10 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunción con la Sociedad para Hematopatología (SH) y la Asociación Europea de Hematopatología (EAHP) propuso nuevas clasificaciones para neoplasias hematopoyéticas (Harris, et al., J Clin Oncol 1999;. 17:3835-3849; Vardiman, et al., Blood 2002; 100: 2292-2302). Para MDS, la OMS utiliza no sólo los criterios morfológicos de la clasificación American-British-French (FAB), sino también características incorporadas disponibles genéticas, biológicas, y clínicas para definir subconjuntos de MDS (Bennett, et al., Br J Haematol 1982.; 51: 189-199). En 2008, la clasificación de la OMS de MDS (Tabla 1) se perfeccionó para 15 permitir subclasificación precisa y pronóstica relevante de la displasia unilinjaje mediante la incorporación de nueva información clínica y científica (Vardiman, et al., Blood 2009; 114: 937-951; Swerdlow, et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4ª Edición. Lyon Francia: IARC Press; 2008: 88-103; Bunning y Germing, "Myelodysplastic syndromes/neoplasms" en el Capítulo 5, Swerdlow, et al., eds. OMS WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (ed 4ª edición): Lyon, Francia: IARC Press; 2008: 88-103).

Tabla 1. Clasificación de la OMS de 2008 para el síndrome mielodisplásico de novo

Subtipo	Sangre	Médula ósea
Citopenia refractaria con displasia unilinjaje (RCUD)	Citopenia única o bicitopenia	Displasia en $\geq 10\%$ de 1 línea celular, $<5\%$ de blastos
Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	Anemia, sin blastos	$\geq 15\%$ de precursores eritroides c/sideroblastos en anillo, displasia eritroide sólo, $<5\%$ de blastos
Citopenia refractaria con displasia multilineaje	Citopenia (s), $<1 \times 10^9/L$ monocitos	Displasia en $\geq 10\%$ de las células en ≥ 2 linajes hematopoyéticos, $\pm 15\%$ sideroblastos en anillo, $<5\%$ de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-1 (AREB-1)	Citopenia(s), $\leq 2\%$ a 4% de blastos, $<1 \times 10^9/L$ monocitos	Unilinjaje o displasia multilineaje, varillas no auer, 5% a 9% de blastos
Anemia refractaria con exceso de blastos-2 (AREB-2)	Citopenia (s), $\leq 5\%$ a 19% de blastos, $<1 \times 10^9/L$ monocitos	Unilinjaje o displasia multilineaje, \pm varillas auer, 10% a 19% de blastos
Síndrome mielodisplásico, sin clasificar (MDS-U)	Citopenias	Unilinjaje o no displasia pero citogenética característica MDS, $<5\%$ de blastos
MDS asociado con aislados del (5q)	Anemia, plaquetas normales o aumentadas	Eritroide unilinjaje. Aislado del(5q), $<5\%$ de blastos

En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es la citopenia refractaria con displasia unilinjaje (RCUD).

50 En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es la anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA).

En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es la citopenia refractaria con displasia multilineaje.

55 En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es la anemia refractaria con exceso de blastos-1 (AREB-1).

En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es la anemia refractaria con exceso de blastos-2 (AREB-2).

60 En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es el síndrome mielodisplásico, no clasificado (MDS-U).

En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es el síndrome mielodisplásico asociado con del(5q) aislado.

En algunas realizaciones, el síndrome mielodisplásico es refractario a los agentes estimulantes de la eritropoyesis.

5 La presente invención proporciona además métodos de tratamiento de psoriasis u otros trastornos de la piel mediante la administración de una formulación tópica que contiene un compuesto de la invención.

En algunas realizaciones, los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden usarse para tratar la hipertensión arterial pulmonar.

10 Los compuestos descritos en la presente pueden usarse en un método de tratamiento de efectos secundarios dermatológicos de otros productos farmacéuticos por la administración del compuesto de la invención. Por ejemplo, numerosos agentes farmacéuticos resultan en reacciones alérgicas no deseadas que pueden manifestarse como erupción acneiforme o dermatitis relacionada. Agentes farmacéuticos ejemplares que tienen tales efectos secundarios indeseables incluyen fármacos anti-cáncer, tales como gefitinib, cetuximab, erlotinib, y similares. Los compuestos de la invención pueden ser administrados sistémicamente o tópicamente (por ejemplo, localizados en el entorno de la dermatitis) en combinación con (por ejemplo, simultánea o secuencialmente) el agente farmacéutico que tiene el efecto secundario dermatológico indeseable. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se puede administrar por vía tópica junto con uno o más de otros productos farmacéuticos, en donde los otros productos farmacéuticos cuando se aplica tópicamente en ausencia de un compuesto de la invención causa la dermatitis de contacto, sensibilización alérgica de contacto, o trastorno de la piel similar. De acuerdo con ello, las composiciones de la invención incluyen formulaciones tópicas que contienen el compuesto de la invención y un agente farmacéutico adicional que pueden causar dermatitis, trastornos de la piel, o efectos secundarios relacionados.

25 Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen la inflamación y enfermedades inflamatorias. Enfermedades inflamatorias ejemplares incluyen sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del ojo (*por ejemplo*, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis, o una enfermedad relacionada), enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (*por ejemplo*, el tracto respiratorio superior, incluyendo la nariz y los senos paranasales, tales como rinitis o sinusitis o el tracto respiratorio inferior incluyendo bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y similares), miopatía inflamatoria tales como miocarditis, y otras enfermedades inflamatorias. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del ojo es la blefaritis.

35 Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento se pueden usar además para tratar las lesiones de isquemia de reperusión o una enfermedad o condición relacionada con un evento isquémico inflamatorio tal como apoplejía o paro cardíaco. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento se pueden usar además para tratar estado de enfermedad de endotoxina impulsado (por ejemplo, complicaciones después de cirugía de bypass o estados de endotoxina crónica que contribuyen a la insuficiencia cardíaca crónica). Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento se pueden usar además para tratar la anorexia, caquexia, o fatiga, tal como la que resulta de o se asocia con el cáncer. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento se pueden usar además para tratar la reestenosis, esclerodermis o fibrosis. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento se pueden usar además para tratar condiciones asociadas con la hipoxia o astrogliosis tal como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer, o la neurodegeneración. Véase, por ejemplo, Dudley, AC et al. Biochem. J. 2005, 390 (Pt 2): 427-36 y Sriram, K. et al. J. Biol. Chem. 2004, 279 (19): 19936-47. Epub 2004 Mar 2. Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento además se pueden utilizar para tratar otras enfermedades inflamatorias tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y choque séptico.

50 Los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden además utilizarse para tratar la gota y tamaño de la próstata aumentado debido, por ejemplo, a la hipertrofia benigna de próstata o hiperplasia prostática benigna.

55 Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades de resorción ósea, tales como osteoporosis, osteoartritis. La resorción ósea también puede estar asociada con otras condiciones tales como el desequilibrio hormonal y/o terapia hormonal, enfermedad autoinmune (por ejemplo, sarcoidosis ósea), o el cáncer (por ejemplo, mieloma). La reducción de la resorción ósea debido a los inhibidores de JAK puede ser de aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, o aproximadamente 90%.

60 En algunas realizaciones, los inhibidores de JAK descritos en el presente documento pueden además usarse para tratar un trastorno del ojo seco. Como se usa en este documento, se pretende que "trastorno del ojo seco" abarque los estados de enfermedad que se resumen en un informe oficial reciente del Dry Eye Workshop (DEWS), que define el ojo seco como "una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que resulta en síntomas de incomodidad, alteración de la visión, y la inestabilidad de la lámina lagrimal con el daño

65

potencial a la superficie ocular. Se acompaña de aumento de la osmolaridad de la lámina lagrimal y la inflamación de la superficie ocular". Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92 de abril de 2007. En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco se selecciona de ojo seco acuoso deficiente en lágrimas (ADDE) o trastorno de ojo seco por evaporación, o combinaciones apropiadas de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco es el síndrome de Sjogren ojo seco (SSDE). En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco es-Sjogren no el síndrome de ojo seco (NSSDE).

Los compuestos descritos en la presente pueden usarse en un método de tratamiento de conjuntivitis, uveítis (incluyendo uveítis crónica), corioiditis, retinitis, ciclitis, scleritis, epiescleritis, o iritis; tratar inflamación o dolor relacionado con trasplante de córnea, LASIK (láser queratomileusis in situ asistido), queratectomía fotorrefractiva, o LASEK (asistida por láser queratomileusis sub-epitelial); inhibición de la pérdida de la agudeza visual relacionada con trasplante de córnea, LASIK, queratectomía fotorrefractiva, o LASEK; o inhibir el rechazo de trasplante en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Además, los compuestos de la invención, o en combinación con otros inhibidores de JAK, tales como los reportados en los Estados Unidos N° de Ser. 11/637.545, se puede utilizar para tratar la disfunción respiratoria o el fracaso asociado con infección viral, tales como la gripe y el SARS.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en cualquiera de las realizaciones en el presente documento, para su uso en un método para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I como se describe en cualquiera de las realizaciones en el presente documento, para la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento.

En la presente se divulga un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de modulación de JAK1. En algunas realizaciones, la presente invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para uso en un método de modulación de JAK1.

Tal como se utiliza aquí, el término "poner en contacto" se refiere a la interposición juntos de restos indicadas en un sistema *in vitro* o un sistema *in vivo*. Por ejemplo, "poner en contacto" una JAK con un compuesto de la invención incluye la administración de un compuesto de la presente invención a un individuo o paciente, tal como un humano, que tiene una JAK, así como, por ejemplo, introducir un compuesto de la invención en una muestra que contiene una preparación celular o purificada que contiene JAK.

Tal como se utiliza aquí, el término "individuo" o "paciente", se usa de forma intercambiable, se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, caballos, o primates, y lo más preferiblemente seres humanos.

Tal como se utiliza aquí, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal que está siendo buscada en un tejido, sistema, animal, individuo o humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1000 mg, o aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a uno o más de (1) prevención de la enfermedad; por ejemplo, la prevención de una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que aún no experimenta o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, condición o trastorno (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología); y (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, condición o trastorno (es decir, revirtiendo la patología y/o sintomatología), tales como la disminución de la gravedad de la enfermedad.

Terapias de combinación

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar a un paciente simultáneamente o secuencialmente.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un agente adicional terapéutico seleccionado del IMiDs, un agente anti-IL-6, un agente anti-TNF- α , un agente de hipometilación, y un modificador de la respuesta biológica (BRM).

Generalmente, un BRM es una sustancia hecha de organismos vivos para tratar la enfermedad, que puede ocurrir naturalmente en el cuerpo o puede estar hecho en el laboratorio. Ejemplos de BRM incluyen ILO-2, interferón, varios tipos de factores estimulantes de colonias (CSF, GM-CSF, G-CSF), anticuerpos monoclonales tales como abciximab, etanercept, infliximab, rituximab, trastuzumab, y ascorbato de dosis alta.

En algunas realizaciones, el agente anti-TNF- α es infliximab y etanercept.

[022] En algunas realizaciones, el agente de hipometilación es un inhibidor de la metiltransferasa de ADN. En algunas realizaciones, el inhibidor de la metiltransferasa de ADN se selecciona de entre 5 azacitidina y decitabina.

Generalmente, IMiDs son agentes inmunomoduladores. En algunas realizaciones, el IMiD se selecciona entre talidomida, lenalidomida, pomalidomida, CC-11006, y CC-10015.

En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional seleccionado de globulina anti-timocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinantes (G-CSF), granulocitos y monocitos CSF (GM-CSF), un agente estimulante de la eritropoyesis (ESA), y ciclosporina.

En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un inhibidor de JAK adicional al paciente. En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK adicional es tofacitinib o ruxolitinib.

Uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, así como PI3K δ , mTOR, Bcr-Abl, Flt-3, inhibidores de la quinasa RAF y FAK tales como, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2006/056399, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad, u otros agentes se pueden utilizar en combinación con los compuestos descritos en este documento para el tratamiento de enfermedades asociadas a JAK, trastornos o condiciones. El uno o más agentes farmacéuticos adicionales se pueden administrar a un paciente simultáneamente o secuencialmente.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen inhibidores de proteosoma (por ejemplo, bortezomib), talidomida, revlimid, y agentes de ADN perjudiciales tales como melfalán, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, etopósido, carmustina, y similares.

Ejemplos de esteroides incluyen corticosteroids tales como dexametasona o prednisona.

Los inhibidores Bcr-Abl ejemplares incluyen los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de los géneros y especies descritas en las patentes de EE.UU. N° 5.521.184, WO 04/005281, y N° de Ser de EE.UU. 60/578.491.

Ejemplos de inhibidores adecuados Flt-3 incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en el documento WO 03/037347, WO 03/099771, y WO 04/046120.

Los inhibidores de la RAF adecuados de ejemplo incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en el documento WO 00/09495 y WO 05/028444.

Los inhibidores ejemplares de FAK adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se describe en el documento WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595, y WO 01/014402.

En algunas realizaciones, uno o más de los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con uno o más de otros inhibidores de quinasa incluyendo imatinib, en particular para el tratamiento de pacientes resistentes a imatinib u otros inhibidores de quinasa.

En algunas realizaciones, un agente quimioterapéutico adecuado puede seleccionarse a partir de agentes antimetabolitos, inhibidores topoisomerasa 1, análogos de platino, taxanos, antraciclina, e inhibidores de EGFR, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, agentes antimetabolitos incluyen capecitabina, gemcitabina, y fluorouracilo (5-FU).

En algunas realizaciones, los taxanos incluyen paclitaxel, Abraxane® (partículas unidas a proteínas de paclitaxel para suspensión inyectable), y Taxotere® (docetaxel).

En algunas realizaciones, los análogos de platino incluyen oxaliplatino, cisplatino y carboplatino.

En algunas realizaciones, inhibidores de topoisomerasa 1 incluyen irinotecán y topotecán.

En alguna realización, antraciclinas incluyen formulaciones doxorubicina o liposomales de doxorubicina.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es FOLFIRINOX (5-FU, lecovorin, irinotecán y oxaliplatino). En algunas formas de realización, el agente quimioterapéutico es gemcitabina y (partículas de albúmina y paclitaxel para suspensión inyectable) Abraxane®.

En algunas realizaciones, uno o más inhibidores de JAK de la invención puede utilizarse en combinación con un agente quimioterapéutico en el tratamiento de cáncer, tal como mieloma múltiple, y puede mejorar la respuesta al tratamiento en comparación con la respuesta a la quimioterapéutico agente solo, sin exacerbación de sus efectos tóxicos. Los ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales que se utilizan en el tratamiento de mieloma múltiple, por ejemplo, pueden incluir, sin limitación, melfalán, melfalán más prednisona [MP], doxorubicina, dexametasona, y Velcade (bortezomib). Otros agentes adicionales usados en el tratamiento del mieloma múltiple incluyen Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK inhibidores de la quinasa. Efectos aditivos o sinérgicos son resultados deseables de la combinación de un inhibidor de JAK de la presente invención con un agente adicional. Además, la resistencia de células de mieloma múltiple a los agentes tales como la dexametasona puede ser reversible tras el tratamiento con un inhibidor de JAK de la presente invención. Los agentes se pueden combinar con los presentes compuestos en una forma de dosificación única o continua, o los agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente como formas de dosificación separadas.

En algunas realizaciones, un ejemplo de corticosteroides como la dexametasona se administra a un paciente en combinación con al menos un inhibidor de JAK, donde se administra la dexametasona de forma intermitente en lugar de continua.

En algunas realizaciones adicionales, las combinaciones de uno o más inhibidores de JAK de la invención con otros agentes terapéuticos pueden administrarse a un paciente antes de, durante, y/o después de un trasplante de médula ósea o trasplante de células.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es acetónido de fluocinolona (Retisert®), o rimexolona (AL-2178, Vexol, Alcon).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es ciclosporina (Restasis®).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un corticosteroide. En algunas realizaciones, el corticosteroide es triamcinolona, dexametasona, fluocinolona, cortisona, prednisolona, o flumetolona.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona de Dehydrex™ (Hölles Labs), Civamide (Opko), hialuronato de sodio (VISMED, Lantibio/TRB Chemedia), ciclosporina (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101 (T) (testosterona, Argentis), AGR1012 (P) (Argentis), sodio ecabet (Senju-ISTA), gefarnato (Santen), 15-(s) ácido hidroxi-eicosatetraenoico (15(S)-HETE), cevilemina, doxiciclina (ALTY-0501, prontosil), minociclina, iDestrin™ (NP50301, Nascent Pharmaceuticals), ciclosporina A (Nova22007, Novagali), oxitetraciclina (Duramicina, Moli1901, Lantibio), CF101 (2S,3S, 4R,5R)-3,4 beta-dihidroxi-5-[6-[(3-yodofenilo) metilamino] purina-9-ilo]-N-metilo-oxolano-2-carbamilo, Can-Fite Biopharma), voclosporina (LX212 o LX214, Lux Biosciences), ARG103 (Argentis), RX-10045 (synthetic resolvin analog, Resolvix), DYN15 (Dyanmis Therapeutics), rivoglitazona (DE011, Daiichi Sanko), TB4 (Regenerx), OPH-01 (Opthalmis Monaco), PCS101 (Pericor Science), REV1-31 (Evolutec), lacritina (Senju), rebamipida (Otsuka-Novartis), OT-551 (Othera), PAI-2 (Universidad de Pennsylvania y la Universidad de Temple), pilocarpina, tacrolimus, pimecrolimus (AMS981, Novartis), etabonato de loteprednol, rituximab, diquafosol tetrasódico (INS365, INSPIRE), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), dehidroepiandrosterona, anakinra, efalizumab, micofenolato sódico, etanercept (Embrel®), hidroxyclorequina, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), actemra, gemcitabina, oxaliplatino, L-asparaginasa, o talidomida.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente anti-angiogénico, agonista colinérgico, trp- modulador^{R1} receptor, un bloqueador de canal de calcio, un secretagogo de mucina, MUC 1 estimulante, un inhibidor de calcineurina, un corticosteroide, un receptor P2Y2 agonista, un agonista de receptor muscarínico, un inhibidor de mTOR, otro inhibidor de JAK, Bcr-Abl, inhibidor de quinasa Flt-3 inhibidor de la quinasa, inhibidor de la cinasa RAF, y el inhibidor de quinasa FAK tal como, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2006/056399.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un derivado de la tetraciclina (por ejemplo, minociclina o doxiciclina). En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se une a FKBP12.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente agente alquilante o ADN de reticulación; un anti-metabolito/agente de desmetilación (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina o azacitidina); una terapia anti-hormonal (por ejemplo, antagonistas del receptor de la hormona, SERMs, o inhibidor de aromatas); un inhibidor de la mitosis (por ejemplo, vincristina o paclitaxel); un inhibidor de topoisomerasa (I o II) (por ejemplo, mitoxantrona y irinotecan); un inductor de apoptosis (por ejemplo, ABT-737); una terapia de ácido nucleico (por ejemplo, antisentido o ARNi); ligandos del receptor nuclear (por ejemplo, agonistas y/o antagonistas de: ácido retinoico todo trans o bexaroteno); agentes de orientación epigenéticos tales como inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo vorinostat), agentes de hipometilación (por ejemplo decitabina); reguladores de la estabilidad de la proteína, tales como inhibidores de Hsp90, ubiquitina y/o la ubiquitina como la conjugación o moléculas de desconjugante; o un inhibidor de EGFR (erlotinib).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional son gotas para los ojos demulcentes (también conocidas como "lágrimas artificiales"), que incluyen, pero no se limitan a, las composiciones que contienen alcohol polivinílico, metilcelulosa de hidroxipropilo, glicerina, polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o celulosa de carboximetilo. Las lágrimas artificiales pueden ayudar en el tratamiento del ojo seco mediante la compensación de la reducción de humidificación y la capacidad de la lámina lagrimal lubricante. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un fármaco mucolítico, tal como N-acetilo-cisteína, que puede interactuar con las mucoproteínas y, por lo tanto, para disminuir la viscosidad de la lámina lagrimal.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional incluye agentes antibióticos, antivirales, antifúngicos, anestésicos, anti-inflamatorios, incluyendo esteroides y no esteroides antiinflamatorios, y agentes anti-alérgicos. Ejemplos de medicamentos adecuados incluyen aminoglucósidos tales como la amikacina, gentamicina, tobramicina, estreptomina, netilmicina, kanamicina y; fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, lomefloxacina, levofloxacina y enoxacina; naftiridina; sulfonamidas; polimixina; cloranfenicol; neomicina; paramomicina; colistimetato; bacitracina; vancomicina; tetraciclinas; rifampicina y sus derivados ("rifampinas"); cicloserina; beta-lactamas; cefalosporinas; anfotericinas; fluconazol; flucitosina; natamicina; miconazol; ketoconazol; corticosteroides; diclofenaco; flurbiprofeno; ketorolaco; suprofen; cromolino; lodoxamida; levocabastina; nafazolina; antazolina; feniramina; o antibiótico de azalida.

Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y se pueden administrar por una variedad de rutas, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y para membranas mucosas incluyendo intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular intraperitoneal o inyección o infusión; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una sola dosis de bolo, o puede ser, por ejemplo, por una bomba de perfusión continua. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (excipientes). En algunas realizaciones, la composición es adecuada para administración tópica. Al hacer las composiciones de la invención, el ingrediente activo se mezcla típicamente con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se encierra dentro de un vehículo tal en la forma de, por ejemplo, una cápsula, bolsita, papel, u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido, que actúa como un vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

En la preparación de una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula de malla inferior a 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula se puede ajustar mediante molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo aproximadamente 40 de malla.

Los compuestos de la invención pueden molerse usando procedimientos de molienda conocidos tales como molienda en húmedo para obtener un tamaño de partícula apropiado para la formación de comprimidos y para otros

tipos de formulaciones. Las preparaciones finamente divididas (nanopartículas) de los compuestos de la invención se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase Aplicación Internacional. N° WO 2002/000196.

5 Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes tales como metilo- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la intervención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

15 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende celulosa microcristalina silicificada (SMCC) y al menos un compuesto descrito en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la celulosa microcristalina silicificada comprende aproximadamente 98% de celulosa microcristalina y dióxido de silicio aproximadamente 2% en peso.

20 En algunas realizaciones, la composición es una composición de liberación sostenida que comprende al menos un compuesto descrito en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un compuesto descrito en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un componente seleccionado a partir de celulosa microcristalina, lactosa de monohidrato, hidroxipropilmetilcelulosa, y óxido de polietileno. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un compuesto descrito en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la celulosa microcristalina, monohidrato de lactosa, e hidroxipropilmetilcelulosa. En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un compuesto descrito en este documento, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y celulosa microcristalina, monohidrato de lactosa, y óxido de polietileno. En algunas realizaciones, la composición comprende además estearato de magnesio o dióxido de silicio. En algunas realizaciones, la celulosa microcristalina es Avicel PH102TM. En algunas realizaciones, el monohidrato de lactosa es 316TM Fast-flo. En algunas realizaciones, metilcelulosa de hidroxipropilo es metilcelulosa de hidroxipropilo 2208 K4M (por ejemplo, Methocel K4 M Premier™) y/o metilcelulosa de hidroxipropilo 2208 K10 0LV (por ejemplo, Methocel K00LV™). En algunas realizaciones, el óxido de polietileno es polietileno WSR óxido de 1105 (por ejemplo, Polyox WSR 1105™).

35 En algunas realizaciones, un proceso de granulación en húmedo se utiliza para producir la composición. En algunas realizaciones, un procedimiento de granulación seca se utiliza para producir la composición.

40 Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de 1 mg a aproximadamente 50 mg, y de aproximadamente 1 mg a 10 mg de ingrediente activo. Preferiblemente, la dosificación es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg o aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de ingrediente activo. En algunas realizaciones, cada dosis contiene aproximadamente 10 mg del ingrediente activo. En algunas realizaciones, cada dosis contiene aproximadamente 50 mg del ingrediente activo. En algunas realizaciones, cada dosis contiene aproximadamente 25 mg del ingrediente activo. El término "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

50 En algunas realizaciones, las composiciones comprenden de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de 1 mg a aproximadamente 50 mg, y de aproximadamente 1 mg a 10 mg de ingrediente activo. Preferiblemente, las composiciones comprenden de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg o aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg de ingrediente activo. Un experto en la técnica apreciará que esto encarna compuestos o composiciones que contienen aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg del activo ingrediente.

60 El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificación y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de compuesto realmente administrada será normalmente determinada por un médico, según las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y similares.

65 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla

homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo normalmente se difunde uniformemente por toda la composición de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide después en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o componerse de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una dosificación interna y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Una variedad de materiales pueden utilizarse para tales capas entéricas o recubrimientos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones de la presente invención pueden incorporarse para administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, sésamo aceite, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe *supra*. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede unir a una tienda de máscara de cara, o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Solución, suspensión, o composiciones en polvo se pueden administrar por vía oral o nasal desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

Las formulaciones tópicas pueden contener uno o más vehículos convencionales. En algunas realizaciones, los ungüentos pueden contener agua y uno o más vehículos hidrófobos seleccionados de entre, por ejemplo, parafina líquida, polioxietileno alquilo éter, propilenglicol, vaselina blanca, y similares. Composiciones de soporte de cremas se pueden basar en agua en combinación con glicerol y uno o más de otros componentes, por ejemplo glicerina monostearato, PEG-glicerina monostearato y alcohol cetiloestearílico. Los geles se pueden formular usando alcohol isopropílico y agua, de forma adecuada en combinación con otros componentes tales como, por ejemplo, glicerol, celulosa de hidroxietilo, y similares. En algunas realizaciones, las formulaciones tópicas contienen al menos aproximadamente 0,1, al menos aproximadamente 0,25, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, o al menos aproximadamente 5% en peso del compuesto de la invención. Las formulaciones tópicas se pueden envasar convenientemente en tubos de, por ejemplo, 100 g que están opcionalmente asociadas con instrucciones para el tratamiento de la indicación de selección, por ejemplo, psoriasis u otra condición de la piel.

La cantidad de compuesto o composición administrada a un paciente variará dependiendo de lo que se está administrando, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la manera de administración, y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se pueden administrar a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis eficaces dependerán de la condición de la enfermedad que se está tratando, así como por el juicio del médico a cargo dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y estado general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en la forma de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse de forma estéril. Las soluciones acuosas pueden envasarse para uso como tales, o liofilizadas, la preparación liofilizada siendo combinada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones de compuesto típicamente estará entre 3 y 11, más preferiblemente de 5 a 9 y lo más preferiblemente de 7 a 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los excipientes, vehículos o estabilizantes anteriores dará como resultado la formación de sales farmacéuticas.

La dosis terapéutica de un compuesto de la presente invención puede variar de acuerdo con, por ejemplo, el uso particular para el que se hace el tratamiento, la manera de administración del compuesto, la salud y el estado del paciente, y el juicio del médico que prescribe. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de una serie de factores que incluyen la dosificación,

características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en una solución de tampón fisiológica acuosa que contiene aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. La dosis es probable que dependa de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente, y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* de modelo o de animales.

Las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más agentes farmacéuticos adicionales tales como un agente quimioterapéutico, un esteroide, un compuesto anti-inflamatorio, o inmunosupresor, ejemplos de los cuales se enumeran anteriormente.

En algunas realizaciones, el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra como una composición oftálmica. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo oftálmicamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición líquida, la composición semi-sólida, inserto, película, micropartículas o nanopartículas.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición líquida. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición semi-sólida. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición tópica. Las composiciones tópicas incluyen, pero no se limitan a composiciones líquidas y semi-sólidas. En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una composición tópica. En algunas realizaciones, la composición tópica comprende una solución acuosa, una suspensión acuosa, una pomada o un gel. En algunas realizaciones, la composición oftálmica se aplica tópicamente a la parte frontal del ojo, bajo el párpado superior, en el párpado inferior y en el cul-de-sac. En algunas realizaciones, la composición oftálmica se esteriliza. La esterilización puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, como la filtración esterilizante de la solución o por calentamiento de la solución en la ampolla lista para su uso. Las composiciones oftálmicas de la invención pueden contener además excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Ejemplos de tales excipientes son agentes conservantes, agentes, agentes quelantes, agentes antioxidantes y sales de tamponamiento para regular la presión osmótica.

Tal como se utiliza aquí, el término "portador oftálmicamente aceptable" se refiere a cualquier material que pueda contener y liberar el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y que es compatible con el ojo. En algunas realizaciones, el portador oftálmicamente aceptable es agua o una solución o suspensión acuosa, pero también incluye aceites tales como los utilizados para hacer ungüentos y matrices de polímeros tales como los usados en insertos oculares. En algunas realizaciones, la composición puede ser una suspensión acuosa que comprende el compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Composiciones oftálmicas líquidas, incluyendo tanto los ungüentos como las suspensiones, pueden tener una viscosidad que es adecuada para la vía de administración seleccionada. En algunas realizaciones, la composición oftálmica tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 30.000 centipoises.

En algunas realizaciones, las composiciones oftálmicas pueden comprender además uno o más de los tensioactivos, adyuvantes, tampones, antioxidantes, ajustadores de tonicidad, conservantes (por ejemplo, EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, polyquaterium-1), espesantes o modificadores de la viscosidad (por ejemplo, carboximetilo celulosa, hidroximetilo celulosa, alcohol de polivinilo, glicol de polietileno, glicol 400, propilenglicol hidroximetilo celulosa, hidroxipropilo-guar, ácido hialurónico, e celulosa de hidroxipropilo) y similares. Aditivos en la formulación pueden incluir, pero no se limitan a, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, aceite de ricino, y perborato de sodio.

Composiciones oftálmicas acuosas (soluciones o suspensiones) generalmente no contienen constituyentes dañinos fisiológicamente o oftálmicamente. En algunas formas de realización, el agua purificada o desionizada se utiliza en la composición. El pH se puede ajustar añadiendo cualesquiera ácidos de ajuste de pH fisiológicamente y oftálmicamente aceptables, bases o tampones a dentro del intervalo de aproximadamente 5,0 a 8,5. Ejemplos oftálmicamente aceptables de ácidos incluyen ácido acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico, y similares, y los ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, trishidroximetilamino-metano, y similares. Las sales y tampones incluyen citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y mezclas de los ácidos y bases anteriormente mencionadas.

En algunas realizaciones, los métodos implican la formación o el suministro de un depósito del agente terapéutico en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente de agente terapéutico que no se elimina rápidamente por las lágrimas u otros mecanismos de eliminación ojo. Esto permite que altas concentraciones continuadas sostenidas de agente terapéutico estén presentes en el fluido sobre la superficie

externa del ojo por una sola aplicación. Sin desear estar vinculado por ninguna teoría, se cree que la absorción y la penetración pueden depender tanto de la concentración de fármaco disuelto como la duración del contacto del tejido externo con el fluido que contiene el fármaco. Cuando el fármaco se elimina por el aclaramiento del fluido ocular y/o la absorción en el tejido ocular, se proporciona más fármaco, por ejemplo se disuelve, en el fluido ocular repuestos desde el depósito. De acuerdo con ello, el uso de un depósito puede facilitar más fácilmente la carga del tejido ocular de agentes terapéuticos más insolubles. En algunas realizaciones, el depósito puede permanecer durante hasta ocho horas o más. En algunas realizaciones, las formas de depósito oftálmicas incluyen, pero no se limitan a, suspensiones acuosas poliméricas, ungüentos e insertos sólidos.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una pomada o gel. En alguna realización, la composición oftálmica es un vehículo de suministro a base de aceite. En algunas realizaciones, la composición comprende una base de petróleo o de lanolina a la que se añade el ingrediente activo, por lo general como 0,1 a 2%, y excipientes. Bases comunes pueden incluir, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la pomada se aplica como una cinta en el párpado inferior.

En alguna realización, la composición oftálmica es un inserto oftálmico. En algunas realizaciones, el inserto oftálmico es biológicamente inerte, suave, bio-erosionable, viscoelástico, estable a la esterilización después de la exposición a los agentes terapéuticos, resistentes a las infecciones de bacterias transmitidas por el aire, bio-erosionable, biocompatible, y/o viscoelástico. En algunas realizaciones, el inserto comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ejemplo, una matriz de polímero. La matriz es típicamente un polímero y el agente terapéutico se dispersa generalmente en la misma o unida a la matriz de polímero. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede liberarse lentamente de la matriz a través de la disolución o la hidrólisis del enlace covalente. En algunas realizaciones, el polímero es bioerosionable (soluble) y la velocidad de disolución del mismo puede controlar la velocidad de liberación del agente terapéutico dispersado en la misma. En otra forma, la matriz de polímero es un polímero biodegradable que se descompone tal como por hidrólisis para liberar de ese modo el agente terapéutico unido a ella o dispersado en la misma. En otras formas de realización, la matriz y el agente terapéutico puede estar rodeado de un recubrimiento polimérico adicional para la liberación adicional de control. En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero biodegradable tal como policaprolactona (PCL), un copolímero de etileno/acetato de vinilo (EVA), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, un nylon, o poli(d-lactida-co-glicolida) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se dispersa en el material de matriz o se dispersa entre la composición de monómero usado para hacer el material de la matriz antes de la polimerización. En algunas realizaciones, la cantidad de agente terapéutico es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50%, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20%. En realizaciones adicionales, la matriz de polímero biodegradable o bioerosionable se utiliza para que el inserto gastado no tiene que ser eliminado. A medida que el polímero biodegradable o bioerosionable se degrada o se disuelve, el agente terapéutico se libera.

En realizaciones adicionales, el inserto oftálmico comprende un polímero, incluyendo, pero no limitado a, los descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., páginas 12-17 (enero de 2008).

En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero seleccionado de polivinilpirrolidona (PVP), un acrilato o polímero o copolímero de metacrilato (por ejemplo, familia Eudragit® de polímeros a partir de Rohm o Degussa), celulosa de hidroximetilo, ácido poliacrílico, poli(amidoamina) dendrímeros, poli(dimetilo siloxano), óxido de polietileno, poli(glicólido láctido-co), poli(2-hidroxietilometacrilato), poli(alcohol de vinilo), o poli(fumarato propileno). En algunas realizaciones, el inserto comprende Gelfoam® R. En algunas realizaciones, el inserto es un ácido poliacrílico de conjugado 450 kDa-cisteína.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una lámina oftálmica. Los polímeros adecuados para tales láminas incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Wagh, et al. (*Ibid*), en algunas realizaciones, la lámina es una lente de contacto blanda, tales como las hechas a partir de copolímeros de N,N-dietiloacrilamida y ácido metacrílico reticulado con dimetacrilato de etiloenglicol.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica comprende microesferas o nanopartículas. En algunas realizaciones, las microesferas comprenden gelatina. En algunas realizaciones, las microesferas se inyectan al segmento posterior del ojo, en el espacio corioroidal, en la esclerótica, por vía intravítrea o sub-retinalmente. En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero, incluyendo, pero no limitado a, los descritos en Wagh, et al. (*Ibid*), que se incorporan aquí por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el polímero es quitosano, un ácido policarboxílico tal como ácido poliacrílico, partículas de albúmina, ésteres de ácido hialurónico, ácido itacónico, poli cianoacrilato (butilo), policaprolactona, poli(isobutilo) caprolactona, poli(ácido láctico-ácido coglicólico) o poli(ácido láctico). En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden partículas lipídicas sólidas.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica comprende una resina de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una zeolita inorgánica o resina orgánica sintética. En

algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico incluye, pero no se limita a, los descritos en Wagh, et al. (*Ibid*). En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una suspensión polimérica acuosa. En algunas realizaciones, el agente terapéutico o un agente de suspensión polimérico se suspende en un medio acuoso. En algunas realizaciones, las suspensiones poliméricas acuosas se pueden formular para que conserven la misma o sustancialmente la misma viscosidad en el ojo que tenían antes de la administración al ojo. En algunas realizaciones, se pueden formular de manera que hay un aumento de la gelificación tras el contacto con el fluido lagrimal.

Compuestos marcados y métodos de ensayo

Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos marcados de la invención (radio-etiquetados, etiquetado fluorescentemente, etc.) que serían útiles no sólo en las técnicas de imagen, sino también en ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, por localizar y cuantificar JAK en muestras de tejido, incluyendo humanos, y para identificar ligandos JAK mediante la unión por inhibición de un compuesto marcado. Por consiguiente, la presente invención incluye ensayos de JAK que contienen dichos compuestos marcados.

La presente invención incluye además compuestos de la invención marcados isotópicamente. Un compuesto "isotópicamente" o "radio-marcado" es un compuesto de la invención en los que uno o más átomos están reemplazados o sustituidos por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico normalmente encontrado en la naturaleza (*es decir*, de forma natural). Los radionúclidos adecuados que pueden incorporarse en compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a ^3H (también escrito como T para tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I . El radionúclido que se incorpora en los compuestos marcados radioactivamente dependerá de la aplicación específica de ese compuesto radiomarcado. Por ejemplo, para etiquetado JAK *in vitro* y ensayos de competencia, los compuestos que incorporan ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o generalmente serán los más útiles. Para aplicaciones de radio-formación de imágenes, ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br o ^{77}Br generalmente serán más útiles.

Se ha de entender que un "compuesto marcado" o "radio-marcado" es un compuesto que ha incorporado al menos un radionúclido. En algunas realizaciones el radionúclido se selecciona entre el grupo que consiste en ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S y ^{82}Br . En algunas realizaciones, el compuesto incorpora 1, 2, o 3 átomos de deuterio.

La presente invención puede incluir, además, métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos de la invención. Los métodos sintéticos para incorporar radioisótopos en compuestos orgánicos son bien conocidos en la técnica, y un experto ordinario en la materia reconocerá fácilmente los métodos aplicables para los compuestos de invención.

Un compuesto marcado de la invención se puede utilizar en un ensayo de cribado para identificar/evaluar compuestos. Por ejemplo, un compuesto recién sintetizado o identificado (*es decir*, compuesto de ensayo) que está marcado puede ser evaluado por su capacidad de unirse a un JAK de seguimiento de su variación de la concentración al ponerse en contacto con la JAK, a través del seguimiento del etiquetado. Por ejemplo, un compuesto de ensayo (marcado) puede evaluarse por su capacidad para reducir la unión de otro compuesto que se sabe que se une a un JAK (*es decir*, compuesto estándar). Por consiguiente, la capacidad de un compuesto de ensayo para competir con el compuesto estándar para la unión a JAK se correlaciona directamente con su afinidad de unión. A la inversa, en algunos otros ensayos de selección, el compuesto estándar se etiqueta y los compuestos de ensayo son no marcados. En consecuencia, la concentración del compuesto estándar marcado se controla con el fin de evaluar la competencia entre el compuesto estándar y el compuesto de ensayo, y la afinidad de unión relativa del compuesto de ensayo se determinó de este modo.

Kits

La presente invención también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con JAK o trastornos, como el cáncer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención. Tales kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de los diversos componentes del kit farmacéutico convencional, tales como, por ejemplo, recipientes con portadores aceptables farmacéuticamente de uno o más recipientes adicionales, etc., como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica. Instrucciones, ya sea como insertos o como etiquetas, que indican cantidades de los componentes a administrar, directrices para la administración y/o directrices para mezclar los componentes, pueden también incluirse en el kit.

La invención se describirá con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los compuestos de los ejemplos se han encontrado para ser inhibidores de JAK de acuerdo con al menos un ensayo descrito en el presente documento.

EJEMPLOS

Los procedimientos experimentales para los compuestos de la invención se proporcionan a continuación.

5 Preparación de libre acceso. Purificación de LC-MS de algunos de los compuestos preparados se realizó en sistemas de fraccionamiento dirigidos por masa Waters. La configuración básica del equipo, protocolos, y software de control para el funcionamiento de estos sistemas se han descrito en detalle en la literatura. Véase, *por ejemplo* "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, J. Combi. Chem, 4, 295 (2002).; "Optimizing Preparative LC-MS Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification", K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, J. Combi. Chem, 5, 670 (2003).; y "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. Chem., 6, 874-883 (2004). Los compuestos separados se someten típicamente a espectrometría analítica de masas de cromatografía líquida (LCMS) para la pureza en las siguientes condiciones: Instrumento; serie Agilent 1100, LC/MSD, Columna: Waters Sunfire™ C₁₈ 5 μm, 2,1 x 5,0 mm, Tapones: fase móvil A: 0,025% de TFA en agua y la fase móvil B: 0,025% de TFA en acetonitrilo; gradiente de 2% a 80% de B en 3 minutos con una velocidad de flujo de 1,5 ml/minuto.

Algunos de los compuestos preparados también fueron separados en una escala preparativa por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con detector de MS o cromatografía flash (gel de sílice) como se indica en el ejemplo. Condiciones de la columna de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa preparativa típica (RP-HPLC) son de la siguiente manera:

pH = 2 purificaciones: Waters Sunfire™ C₁₈ 5 μm, 19 columna x 100 mm, eluyendo con fase móvil A: 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) en agua y eluyente B: acetonitrilo; la velocidad de flujo fue de 30 ml/minuto, el gradiente de separación se ha optimizado para cada compuesto usando el protocolo de optimización de método de compuesto específico como se describe en la literatura [Véase "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Típicamente, la velocidad de flujo se utiliza con la columna 30 x 100 mm fue de 60 ml/minuto.

pH = 10 purificaciones: Waters XBridge C₁₈ 5 μm, 19 columna x 100 mm, eluyendo con fase móvil A: 0,15% de NH₄OH en agua y la fase móvil B: acetonitrilo; la velocidad de flujo fue de 30 ml/minuto, el gradiente de separación se ha optimizado para cada compuesto usando el protocolo de método de optimización de compuesto específico como se describe en la literatura [Véase "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Típicamente, la velocidad de flujo se utiliza con la columna 30 x 100 mm fue de 60 ml/minuto.

Algunos de los compuestos preparados también se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Condiciones del instrumento de DSC típicas son las siguientes:

TA Instruments Differential Scanning Calorimetry, Model Q200 con inyector automático. Condiciones generales: 30-350°C a 10°C/min; plato y tapa de muestras de aluminio Tzero; flujo de gas nitrógeno a 50 mL/min.

Algunos de los compuestos preparados también se analizaron mediante análisis termogravimétrico (TGA). Las condiciones típicas del instrumento de TGA son las siguientes:

TA Instrument Thermogravimetric Analyzer, Model Q500. Condiciones generales de procedimiento: rampa de 20°C a 600°C a 20°C/min; purga de nitrógeno, el flujo de gas a 40 ml/min seguido de equilibrio del flujo de purga; flujo de purga muestra a 60 ml/min; platino patillo de muestras.

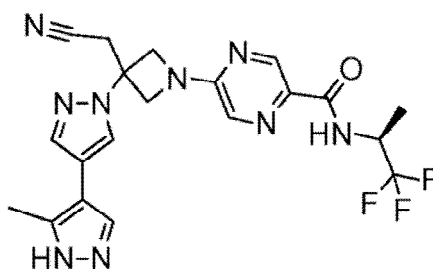
Algunos de los compuestos preparados también se analizaron a través de difracción de potencia de rayos X (XRPD). Condiciones del instrumento XRPD típicos son como sigue:

Rigaku MiniFlex X-ray Powder Diffractometer (XRPD). Procedimientos experimentales generales: la radiación de rayos X a partir de cobre en 1,054056Å con filtro K_β; la potencia de rayos X es 30 KV, 15 mA; polvo de la muestra se dispersa en un soporte de muestra cero fondo. Condiciones de medición generales: Ángulo inicial - 3 grados; Ángulo de tope - 45 grados; Muestreo-0,02 grados; Velocidad de escaneo - 2 grados/min.

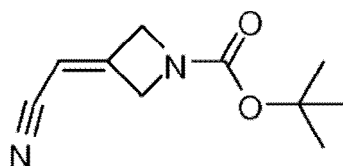
Ejemplo 1. 5-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida

60

65

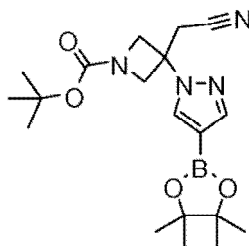


Paso 1: *terc*-butilo 3-(cianometilo)azetidina-1-carboxilato



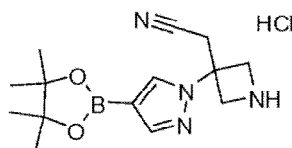
A una solución de 1,0 M de potasio *terc*-butóxido se añadió gota a gota una solución de cianometilofosfonato de dietilo (5,20 ml, 32,2 mmol) en tetrahidrofurano (39 ml) en tetrahidrofurano (30,7 ml, 30,7 mmol) a 0°C. La reacción se calentó a temperatura ambiente y después se enfrió a 0°C de nuevo. A la mezcla de reacción se añadió una solución de *terc*-butilo 3-oxoazetidina-1-carboxilato de etilo (5,0 g, 0,029 mol, de Aldrich) en tetrahidrofurano (8 ml). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Después de inactivarse con agua, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (EtOAc). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, y se evaporaron a presión reducida. La mezcla bruta se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexanos (0-70%) para dar el producto deseado (5,40 g, 95%). LCMS caclid. para C₁₀H₁₄N₂O₂Na_v (M+Na)⁺:m/z = 217,1; Encontrado: 217,1

Paso 2: 3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo] azetidina-1-carboxilato



Una mezcla de 4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol (0,990 g, 5,10 mmol), *terc*-butilo 3-(cianometilo)azetidina-1-carboxilato de metilo (1,00 g, 5,15 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0,38 ml, 2,6 mmol) en acetonitrilo (20 ml) se calentó a 60°C durante 2 h. Después de enfriarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexanos (0-60%) para proporcionar el producto deseado (1,68 g, 84,8%). LCMS caclid. para C₁₅H₂₂BN₄O₄ (M-55)⁺:m/z = 333,2; Encontrado: 333,1.

Paso 3: ácido {3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo] azetidina-3-ilo}acetonitrilo

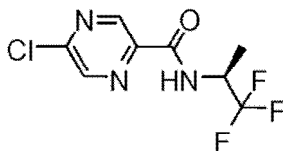


4,0 N HCl en 1,4-dioxano (2,0 ml) se añadió a la solución de *terc*-butilo 3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo] azetidina-1-carboxilato de metilo (1,68 g, 4,33 mmol) en cloruro de metileno (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se

concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto deseado como sal de HCl, que se usó directamente en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. LCMS cacl. para $C_{14}H_{22}BN_4O_2$ (M+1)⁺:m/z = 289,2; Encontrado: 289,1.

5 *Paso 4: 5-cloro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-carboxamida*

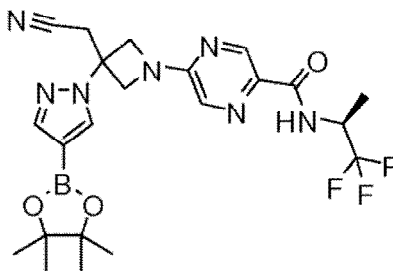
10



15 *N,N*-diisopropiletiloamina (1,3 ml, 7,5 mmol) se añadió a una mezcla de 5-cloropirazina-2-ácido carboxílico (0,40 g, 2,5 mmol), *N,N,N'*-tetrametilo-O-(7-azabenzotriazol-1-ilo)hexafluorofosfato de uronio (1,0 g, 2,8 mmol) y (2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-amina (0,28 g, 2,5 mmol) en cloruro de metileno (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se trató con una solución sat. acuosa de NaHCO₃, y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice con acetato de etilo en hexanos (0-15%) para proporcionar el producto deseado (0,47 g, 73%). LCMS cacl. para $C_8H_8ClF_3N_3O$ (M+1)⁺:m/z = 254,0; Encontrado: 253,9.

25 *Paso 5: 5-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-carboxamida*

30



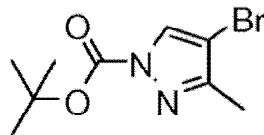
35

40 Una mezcla de 5-cloro- *N*-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-carboxamida (254 mg, 1,00 mmol), {3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-3-ilo}acetonitrilo sal HCl (325 mg, 1,00 mmol) y *N,N*-diisopropiletiloamina (401 μl, 2,30 mmol) en 1,4-dioxano (5,0 ml) se calentó a 100°C durante 2 h. Después de enfriarse, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexano (gradiente: 20-80%) para proporcionar el producto deseado (0,49 g, 97%). LCMS cacl. para $C_{22}H_{28}BF_3N_7O_3$ (M+1)⁺:m/z = 506,2; Encontrado: 506,1.

45

Paso 6: terc-butilo-4-bromo-3-metilo-1H-pirazol-1-carboxilato de metilo

50



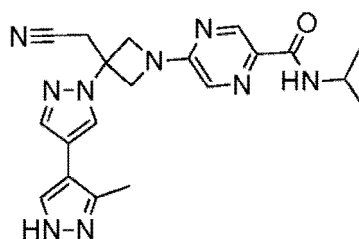
55

60 Una mezcla de 4-bromo-3-metilo-1H-pirazol (0,2 g, 1 mmol), *di-terc*-butildicarbonato (0,30 g, 1,4 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0,02 g, 0,1 mmol) y trietiloamina (0,26 ml, 1,9 mmol) en acetonitrilo (2 ml) se agitó a ta durante una noche. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexanos (0-15%) para proporcionar el producto deseado (0,32 g). LCMS cacl. para $C_9H_6BrN_2O_2$ (M-55)⁺:m/z = 205,0; Encontrado: 204,9.

65 *Paso 7: 5-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiletilo]*

trifluoroacetato pirazina-2-carboxamida

Una mezcla de 5- {3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-carboxamida (27,0 mg, 0,0533 mmol), *tert*-butilo 4-bromo-3-metilo-1H-pirazol-1-carboxilato de metilo (15 mg, 0,059 mmol), tetrakis (trifenilofosfina) paladio (0) (3,1 mg, 0,0027 mmol) y carbonato de sodio (17,0 mg, 0,160 mmol) en 1,4-dioxano (1,6 ml) y agua (0,8 ml) en atmósfera de nitrógeno se agitó a 100°C durante la noche. La mezcla de reacción se filtró, y se purificó mediante RP-HPLC (pH = 2 condiciones) para proporcionar el producto deseado como sal de TFA. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8,73 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 8,18 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H), 7,98 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,91-7,79 (m, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,81 (d, *J* = 10,2 Hz, 2H), 4,60 (d, *J* = 10,2 Hz, 2H), 3,59 (s, 2H), 2,44 (s, 3H), 1,43 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm. LCMS *cacl.d.* para C₂₀H₂₁F₃N₉O (M+1)⁺:m/z = 460,2; Encontrado: 460,0.

Ejemplo 2. 5-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida*Paso 1: 5-cloro-N-isopropilpirazina-2-carboxamida*

N,N-Diisopropiletiloamina (2,6 ml, 15 mmol) se añadió a una mezcla de 5-cloropirazina-2-ácido carboxílico (0,80 g, 5,0 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetiloamino)fosfonio (2,46 g, 5,56 mmol) y 2-propanamina (0,47 ml, 5,6 mmol) en cloruro de metileno (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se trató con una solución sat. acuosa de NaHCO₃, y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexano (0-15%) para proporcionar el producto deseado. LCMS *cacl.d.* para C₈H₁₁ClN₃O (M+1)⁺:m/z = 200,1; Encontrado: 200,1.

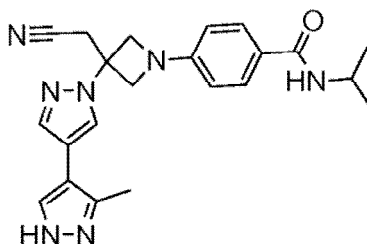
Paso 2: 5-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida

Una mezcla de 5-cloro-*N*-isopropilpirazina-2-carboxamida (200 mg, 1,00 mmol), {3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-3-ilo}acetronitrilo sal HCl (325 mg, 1,00 mmol, del Ejemplo 1, etapa 3) y *N,N*-diisopropiletiloamina (401 µl, 2,30 mmol) en 1,4-dioxano (5,0 ml) se calentó a 100°C durante 2 h. Después de enfriarse, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexano (gradiente: 20-80%) para proporcionar el producto deseado (0,26 g, 58%). LCMS *cacl.d.* para C₂₂H₃₁BN₇O₃ (M+1)⁺:m/z = 452,3; Encontrado: 452,2.

Paso 3: 5-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida

Una mezcla de *tert*-butilo 4-bromo-3-metilo-1H-pirazol-1-carboxilato de etilo (15,7 mg, 0,0600 mmol), 5-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-*N*-isopropilpirazina-2-carboxamida (25,8 mg, 0,0571 mmol), dicloropaladio (II) complejo con diclorometano (1 [1,1'-bis(difenilofosfina ferroceno)]: 1) (2,3 mg, 0,0028 mmol) y fosfato de potasio (0,036 g, 0,17 mmol) en dioxano (0,5 ml) y agua (0,2 ml) en un vial de reacción se desgasificó y se selló. La mezcla se calentó a 110°C durante 3 h. Después de enfriarse, la mezcla se diluyó con metanol, se filtró y se purificó por RP-HPLC (pH = 2 condiciones) para proporcionar el producto deseado como sal de TFA. LCMS *cacl.d.* para C₂₀H₂₄N₉O (M+1)⁺:m/z = 406,2; Encontrado: 406,1.

Ejemplo 3. 4-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilbenzamida trifluoroacetato



Paso 1: 4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo) benzoato de metilo

Una mezcla de acetato de 4-fluorobenzoato (0,841 g, 5,00 mmol, de Aldrich), acetidina-3-ol de hidrocloreto (0,438 g, 4,00 mmol, de Aldrich) y carbonato potásico (1,38 g, 9,98 mmol) en sulfóxido de dimetilo (4 ml) se calentó a 18 °C durante 2 h. Después de enfriarse, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (50 ml), y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice con acetato de etilo en hexano (0-50%) para proporcionar el producto deseado (0,643, 72,6%). LCMS *cacl.d.* para C₁₂H₁₆NO₃ (M+1)⁺:m/z = 222,1; Encontrado: 222,1.

Paso 2: 4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)ácido benzoico

Una mezcla de 1-[4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)fenilo]-2-metoxietanona (1,33 g, 6,00 mmol) y monohidrato de hidróxido de litio (504 mg, 12,0 mmol) en agua (4 ml), metanol (3 ml) y THF (6 ml) se agitó a 40 °C durante la noche. La mezcla se neutralizó con solución de HCl 3 N acuoso (~ 4 ml) a un pH de aproximadamente 7, se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto bruto (1,10 g, 94,9%) que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS *cacl.d.* para C₁₀H₁₂NO₃ (M+1)⁺:m/z = 194,1; Encontrado: 194,1.

Paso 3: 4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)-N-isopropilbenzamida

Benzotriazol-1-iloxitris(dimetiloamino)hexafluorofosfato de fosfonio (4,64 g, 10,5 mmol, de Aldrich) se añadió a una mezcla de 4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)ácido benzoico (1,93 g, 10,0 mmol), 2-propanamina (4,26 ml, 50,0 mmol) y N,N-diisopropiletiloamina (3,88 g, 30,0 mmol) en diclorometileno (10 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, y se diluyó con diclorometano. La mezcla se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexano (gradiente: 0-50%) para proporcionar el producto deseado (2,21 g, 94,3%). LCMS *cacl.d.* para C₁₃H₁₉N₂O₂ (M+1)⁺:m/z = 235,1; Encontrado: 235,1.

Paso 4: N-isopropilo-4-(3-oxoacetidina-1-ilo) benzamida

A una solución enfriada (78 °C) de cloruro de oxalilo (1,05 ml, 12,4 mmol) en diclorometileno (20 ml) se añadió gota a gota sulfóxido de dimetilo (1,71 ml, 24,1 mmol). La mezcla se agitó a 78 °C durante 10 min. A continuación, una suspensión de 4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)-N-isopropilbenzamida (1,72 g, 7,34 mmol) en diclorometileno (20 ml) se añadió. La mezcla se agitó a 78 °C durante 1 h, y después se añadió trietiloamina (7,04 ml, 50,5 mmol). La mezcla se agitó a 78 °C durante 1,5 h. La mezcla se lavó con HCl ac. NaHCO₃ y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Los precipitados se lavaron con éter y se recogieron por filtración para proporcionar el producto deseado (1,32 g, 77%) que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS *cacl.d.* para C₁₃H₁₇N₂O₂ (M+1)⁺:m/z = 233,1; Encontrado: 233,1.

Paso 5: 4-[3-(cianometiloen)acetidina-1-ilo]-N-isopropilbenzamida

A una solución enfriada (a -6 de -0 °C) de 1,0 M de potasio *terc*-butóxido en tetrahidrofurano (7,10 ml, 7,10 mmol) se añadió gota a gota una solución de cianometilofosfonato de dietilo (1,20 ml, 7,43 mmol, de Aldrich) en tetrahidrofurano (10 ml) durante un período de 10 min y a -6 hasta 0 °C. La reacción se calentó y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió a -6 °C de nuevo. A la mezcla de reacción se le añadió una solución de N-isopropilo-4-(3-oxoacetidina-1-ilo)benzamida (1,30 g, 5,60 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) durante un período de 10 min. Durante este tiempo la temperatura de la mezcla de reacción era de entre -5 a 0 °C. La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se concentró, y el residuo se trató con éter. Los precipitados formados se recogieron por filtración para dar 0,60 g del producto deseado. El líquido madre se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexano (gradiente: 30-80%) para proporcionar el producto deseado (0,21 g). El producto total es de 0,81 g (57%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,91 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,74 (d, J = 8,7 Hz,

2H), 6,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 5,88 (p, $J = 2,3$ Hz, 1H), 4,77-4,67 (m, 2H), 4,62 (dt, $J = 5,1, 2,6$ Hz, 2H), 4,06 (m, 1H), 1,12 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H) ppm. LCMS *cacl.* para $C_{15}H_{18}N_3O$ ($M+1$)⁺: $m/z = 256,1$; Encontrado: 256,1.

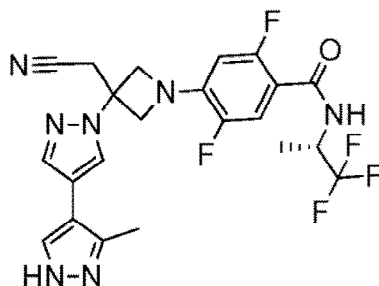
Paso 6: 4-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-N-isopropilbenzamida

Una mezcla de 4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol (2,98 g, 15,3 mmol), 4-[3-(cianometilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilbenzamida (4,00 g, 15,7 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (1,17 g, 7,68 mmol) en alcohol isopropílico (10 mL) se calentó a 70°C durante 1 h. La mezcla se enfría a 35°C. Se añadieron a la suspensión 30 mL de metilo *terc*-butilo éter (MTBE), y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Los precipitados formados se recogieron por filtración, se lavaron con MTBE, y se secaron a presión reducida para proporcionar el producto deseado (6,2 g 89,8%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,35 (s, 1H), 7,90 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,73 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 6,52 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,20 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,65 (s, 2H), 1,24 (s, 12H), 1,12 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H) ppm. LCMS *cacl.* para $C_{24}H_{33}BN_5O_3$ ($M+1$)⁺: $m/z = 450,3$; Encontrado: 450,3.

Paso 7: 4-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-trifluoroacetato de isopropilbenzamida

Una mezcla de *terc*-butilo 4-bromo-3-metilo-1H-pirazol-1-carboxilato de etilo (15,7 mg, 0,0600 mmol), 4-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-N-isopropilbenzamida (25,7 mg, 0,0571 mmol), fosfato de potasio (36,4 mg, 0,171 mmol) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio (II) con diclorometano (1:1) (2,33 mg, 0,00286 mmol) en dioxano (0,5 ml) y agua (0,2 mL) en un vial de reacción se desgasificó y se selló. La mezcla se calentó a 110°C durante 3 h. Después de enfriarse, la mezcla se diluyó con metanol, se filtró y se purificó por RP-HPLC (pH = 2 condiciones) para proporcionar el producto deseado como sal de TFA. LCMS *cacl.* para $C_{22}H_{26}N_7O$ ($M+1$)⁺: $m/z = 404,2$; Encontrado: 404,1.

Ejemplo 4. 4-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-bipirazol-1-ilo-4,4')azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida



Paso 1: 2,4,5-trifluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

A una solución de 2,4,5-ácido trifluorobenzoico (5,00 g, 28,4 mmol) en acetonitrilo (50 mL) se añadió *N,N*-dimetilformamida (40 µl) seguido de la adición de cloruro de oxalilo (3,60 mL, 42,6 mmol). Después de 90 min, los volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se co-evaporó con acetonitrilo (50 mL). Después, el residuo se disolvió en cloruro de metileno (50 mL). Esta solución se añadió gota a gota a una mezcla enfriada (baño de hielo) de (2S) hidrocloreto de 1,1,1-trifluoro-propan-2-amina (5,52 g, 36,9 mmol) (del Synquest, 98% ee) en tolueno (100 mL) y solución acuosa de hidróxido de sodio 0,5 M (142 mL, 71,0 mmol). Después de la adición, se retiró el baño de hielo y la reacción se dejó calentar a ta. La reacción se agitó durante la noche. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera al 20% (75 mL) y agua (2 x 75 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto deseado (6,49 g, 84%) que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,01 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,92-7,50 (m, 2H), 4,76 (m, 1H), 1,31 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H) ppm. LCMS *cacl.* para $C_{10}H_8F_6NO$ ($M+1$)⁺: $m/z = 272,0$; Encontrado: 272,0.

Paso 2: 2,5-difluoro-4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

Una mezcla de 2,4,5-trifluoro- N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (6,39 g, 23,6 mmol), azetidina-3-ol clorhidrato (3,19 g, 28,3 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (8,81 mL, 58,9 mmol) en acetonitrilo (25 mL) se agitó a 80°C durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (75 mL) y se lavó con HCl 1N (50 mL), 1N NaHCO₃ (60 mL), salmuera al 20% (50 mL) y agua (75 mL). Las capas acuosas se extrajeron con EtOAc (100 mL). las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para

dar el producto deseado (7,59 g, 91,8%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ 8,38 (dd, *J* = 8,9, 1,9 Hz, 1H), 7,27 (dd, *J* = 12, 8, 6,5 Hz, 1H), 6,38 (dd, *J* = 12,3, 7,5 Hz, 1H), 5,71 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,74 (dp, *J* = 15,3, 7,6 Hz, 1H), 4,62-4,46 (m, 1H), 04/30 a 04/15 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 1,29 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm. LCMS *cacl**d.* para C₁₃H₁₄F₅N₂O₂ (M+1)⁺:m/z = 325,1; Encontrado: 325,1.

5

Paso 3: 2,5-difluoro-4-(3-oxoazetidina-1-ilo)-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

A una solución de 2,5-difluoro-4-(3-hidroxiacetidina-1-ilo)-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (7,57 g, 23,3 mmol) en cloruro de metileno (93 mL) se añadió diacetato de yodobenceno (9,40 g, 29,2 mmol) y 2,2,6,6-tetram-etilo-1-piperidinilo radical libre (1,82 g, 11,7 mmol) (TEMPO) en la sala de temperatura. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 mL), se lavó con 0,5 N de NaHCO₃ (2x80 mL), salmuera al 20% (100 mL) y agua (100 mL). Las capas acuosas se extrajeron con acetato de etilo (75 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo del 0% al 5% en cloruro de metileno para proporcionar el producto bruto que se recristalizó en MTBE (50 mL) y heptano (100 mL) para dar el producto deseado (5,44 g, 72%) como un sólido incoloro. ¹H RMN (300 MHz, DMSO- *d*₆) δ 8,52 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J* = 12,5, 6,5 Hz, 1H), 6,63 (dd, *J* = 12,1, 7,6 Hz, 1H), 4,90 (d, *J* = 2,1 Hz, 4H), 4,86-4,68 (m, 1H), 1,31 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm. LCMS *cacl**d.* para C₁₃H₁₂F₅N₂O₂ (M+1)⁺:m/z = 323,1; Encontrado: 323,0.

20

Paso 4: 4-[3-(Cianometileno)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

Se añadió dietilo cianometilfosfonato (1,95 mL, 11,8 mmol) gota a gota a una solución enfriada (baño de hielo) de 1,0 M de potasio *terc*-butóxido en THF (11,8 mL, 11,8 mmol) que se diluyó con tetrahidrofurano (12 mL). El baño se retiró y la reacción se calentó a temperatura ambiente, y se agitó durante 90 min. La solución de reacción se enfrió con un baño de hielo de nuevo. Después se añadió la solución preparada anteriormente durante 12 min a una solución enfriada (baño de hielo) de 2,5-difluoro-4-(3-oxoazetidina-1-ilo)-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (4,00 g, 12,4 mmol) en tetrahidrofurano (50 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. El baño de hielo se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después se inactivó por la adición de salmuera al 20% (75 mL) y acetato de etilo (75 mL). La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice con acetato de etilo en hexanos (0% a 30%) para dar el producto deseado (2,6 g). ¹H RMN (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 8,59-8,37 (m, 1 H), 7,33 (dd, *J* = 12,5, 6,4 Hz, 1H), 6,59 (dd, *J* = 12,0, 7,4 Hz, 1H), 5,88 (m, 1H), 4,94-4,75 (m, 4H), 4,76 (m, 1H), 1,31 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm. LCMS *cacl**d.* para C₁₅H₁₃F₅N₃O (M+1)⁺:m/z = 346,1; Encontrado: 346,1.

35

Paso 5: 4-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-2,5-difluor dife--N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

40

Una mezcla de 4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol (1,00 g, 5,15 mmol), 4-[3-(cianometileno)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (1,78 g, 5,15 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0,31 mL, 2,1 mmol) en acetonitrilo (20,2 mL) se calentó a 50°C durante la noche. Después de enfriarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS *cacl**d.* para C₂₄H₂₈BF₅N₅O₃ (M+1)⁺:m/z = 540,2; Encontrado: 540,1.

45

Paso 6: 4-[3-(cianometilo)-3-(3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamidatrilfluoroacetato

Una mezcla de 4-[3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (28,8 mg, 0,0533 mmol), *terc*-butilo-4-bromo-5-metilo-1H-pirazol-1-carboxilato (15 mg, 0,059 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (3,1 mg, 0,0027 mmol) y carbonato de sodio (17,0 mg, 0,160 mmol) en 1,4-dioxano (1,6 mL) y agua (0,8 mL) en atmósfera de nitrógeno se agitó a 100°C durante la noche. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por RP-HPLC (pH = 2 condiciones) para proporcionar el producto deseado como sal de TFA. LCMS *cacl**d.* para C₂₂H₂₁F₅N₇O (M+1)⁺:m/z = 494,2; Encontrado: 494,0.

55

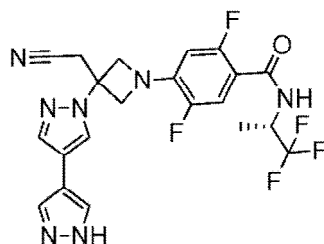
Ejemplo 5. 4-[3-(1 H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)-3-(cianometilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

60

65

5

10



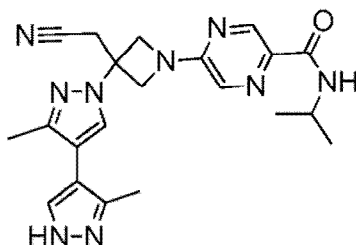
15

Este compuesto se preparó usando procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 4, partiendo Paso 6 de 4-bromo-1H-pirazol y ácido 4-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida. LCMS *cacl.* para C₂₁H₁₉F₅N₇O (M+1)⁺:m/z = 480,2; Encontrado: 480,0.

20

Ejemplo 6. 5-[3-(cianometilo)-3-(3,3'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida

25



30

35

Paso 1: 3-(cianometilo)-3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-carboxilato de metilo

40

Una mezcla de 3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol (1,06 g, 5,10 mmol), *tert*-butilo 3-(cianometilo)azetidina-1-carboxilato de metilo (1,00 g, 5,15 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (0,38 mL, 2,6 mmol) en acetonitrilo (20 mL) se calentó a 60°C durante 2 h. Después de enfriarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexanos (0-60%) para proporcionar el producto deseado. LCMS *cacl.* para C₁₆H₂₄BN₄O₄ (M-55)⁺:m/z = 347,2; Encontrado: 347,1.

45

Paso 2: {3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-3-ilo}acetónitrilo clorurohidrato

50

4,0 N HCl en dioxano (3 mL) se añadió a una solución de *tert*-butilo 3-(cianometilo)-3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-carboxilato de etilo en cloruro de metileno (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto como sal HCl. LCMS *cacl.* para C₁₅H₂₄BN₄O₂ (M+1)⁺:m/z = 303,2; Encontrado: 303,1.

55

Paso 3: 5-[3-(cianometilo)-3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida

60

Una mezcla de {3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-3-ilo}acetónitrilo sal HCl (0,43 g, 1,3 mmol), 5-cloro-N-isopropilpirazina-2-carboxamida (0,24 g, 1,2 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (0,63 mL, 3,6 mmol) en *tert*-alcohol de butilo (12 mL, 120 mmol) se calentó a 100°C durante 4 h. Después de enfriarse, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice eluyendo con acetato de etilo en hexanos (0-60%) para proporcionar el producto deseado. LCMS *cacl.* para C₂₃H₃₃BN₇O₃ (M+1)⁺:m/z = 466,3; Encontrado: 466,2.

65

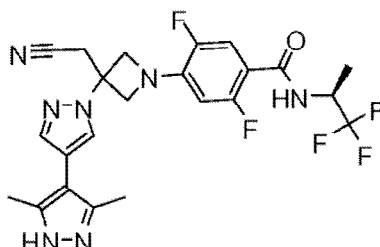
Paso 4: 5-[3-(cianometilo)-3-(3,3'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida de trifluoroacetato

Este compuesto se preparó usando procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 4,

partiendo paso 6 de 4-bromo-3-metilo-1*H*-pirazol y ácido 5-{3-(cianometilo)-3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1*H*-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-*N*-isopropilopirazina-2-carboxamida. LCMS *cacl*d. para C₂₁H₂₆N₉O (M+1)⁺:m/z = 420,2; Encontrado: 420,1.

5 **Ejemplo 7. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida**

10



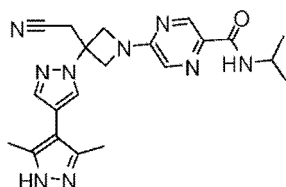
15

Una mezcla de 4-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1*H*-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (329 mg, 0,610 mmol, del Ejemplo 4, paso 5), 4-bromo-3,5-dimetilo-1*H*-pirazol (206 mg, 1,18 mmol), tetrakis (trifenilofosfina) paladio (0) (110 mg, 0,098 mmol) y carbonato de sodio (320 mg, 3,0 mmol) en 1, 4-dioxano (10 mL)/agua (5 mL) se purgó con nitrógeno y se agitó a 110°C durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con agua y salmuera, se concentró. El residuo se purificó primero con gel de sílice (eluyendo con EtOAc al 0-100%/hexanos seguido de metanol al 10%/diclorometano), y luego por HPLC prep-LCMS (columna XBridge C18, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo/agua que contiene 0,1% de amonio hidróxido, a un caudal de 60 mL/min) para dar el producto deseado (30 mg, 9,7%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO- *d*₆) δ 12,17 (1H, s), 8,45 (1H, d, *J* = 8,0 Hz), 8,10 (1H, s), 7,70 (1H, s), 7,34 (1H, m), 6,61 (1H, s), 4,77 (1H, m), 4,62 (2H, d, *J* = 9,0 Hz), 4,39 (1H, d, *J* = 9,0 Hz), 3,64 (2H, s), 2,22 (6H, s), 1,31 (6H, d, *J* = 7,0 Hz) ppm. LCMS calculada para C₂₃H₂₃F₅N₇O (M+H)⁺:m/z = 508,2; Encontrado: 508,0.

30

35 **Ejemplo 8. 5-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-*N*-isopropilopirazina-2-carboxamida**

35



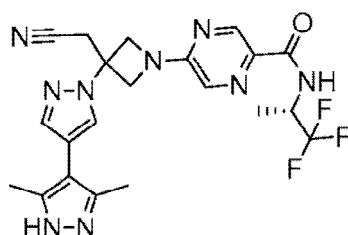
40

Una mezcla de 5-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1*H*-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-*N*-2-carboxamida-isopropilopirazina (256 mg, 0,567 mmol, del Ejemplo 2, paso 2), 4-bromo-3,5-dimetilo-1*H*-pyra- zole (119 mg, 0,681 mmol), diciclohexil (2', 4', 6'-triisopropilo-bifenilo-2-ilo) fosfina-(2'-aminobifenilo-2-ilo) (cloro) paladio (1: 1) (67 mg, 0,085 mmol) y carbonato de cesio (550 mg, 1,7 mmol) en 1,4-dioxano (2 mL)/agua (1 mL) se purgó con nitrógeno tres veces. La reacción se calentó a 53°C durante 2 h. La mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con salmuera, se concentró. El residuo resultante se purificó primero en gel de sílice (eluyendo con EtOAc al 0-100%/hexanos seguido de metanol al 10%/diclorometano), y luego por HPLC prep-LCMS (columna XBridge C18, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía hidróxido de amonio al 0,1%, a un caudal de 60 mL/min) para dar el producto deseado (0,1 g, 40%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO- *d*₆) δ 8,64 (1H, d, *J* = 1,5 Hz), 8,12 (1H, s), 8,06 (1H, d, *J* = 8,0 Hz), 7,96 (1H, d, *J* = 1,0 Hz), 7,71 (1H, s), 4,72 (2H, d, *J* = 9,5 Hz), 4,49 (1H, d, *J* = 9,5 Hz), 4,08 (1H, m), 3,68 (2H, s), 2,22 (6H, s), 1,16 (6H, d, *J* = 6,5 Hz) ppm. LCMS calculada para C₂₁H₂₆N₉O (M+H)⁺:m/z = 420,2; Encontrado: 420,0.

50

55 **Ejemplo 9. 5-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida**

60



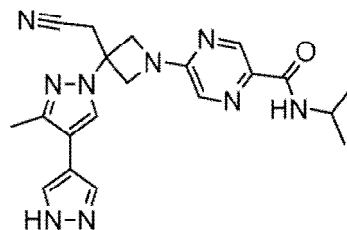
65

Paso 1. [3-(3',5'-dimetilo-1H, 1H-4, 4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-3-ilo]acetonitrilo de clorhidrato

5 Una mezcla de *tert*-butilo 3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-carboxilato de metilo (381 mg, 0,981 mmol, del Ejemplo 1, paso 2), 4-bromo-3,5-dimetilo-1H-pirazol (206 mg, 1,18 mmol), tetrakis (trifenilfosfina) paladio (0) (110 mg, 0,098 mmol) y carbonato de sodio (310 mg, 2,9 mmol) en 1,4-dioxano (10 mL) y agua (5 mL) se purgó con N₂ y se agitó a 110°C durante 2 h. La mezcla de reacción se filtró, se diluyó con EtOAc, después se lavó con agua. La capa orgánica se concentró y se purificó sobre gel de sílice (eluyendo con EtOAc al 0-100%/hexanos seguido de MeOH al 0-10%/diclorometano) para dar *tert*-butilo 3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-carboxilato de metilo (90 mg, 26%). LCMS calculada para C₁₈H₂₅N₆O₂ (M+H)⁺:m/z = 357,2; Encontrado: 357,2. Este intermedio se trató con cloruro de 4,0 M de hidrógeno en dioxano (1,2 mL, 4,9 mmol) en cloruro de metileno (1 mL) a ta durante 2 h. La mezcla se evaporó a sequedad para dar el producto deseado. LCMS calculada para C₁₃H₁₇N₆(M+H)⁺:m/z = 257,1; Encontrado: 257,1.

Paso 2. 5-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiletilo]pirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida

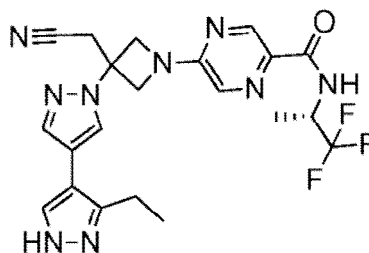
20 Una mezcla de [3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-3-ilo]clorhidrato de acetonitrilo (13 mg, 0,039 mmol), 5-cloro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiletilo]pirazina-2-carboxamida (11 mg, 0,043 mmol, del Ejemplo 1, Paso 4) y N,N-diisopropiletiloamina (28 µl, 0,16 mmol) en *tert*-alcohol de butilo (1 mL) se calentó a 100°C durante 2 h. Después de enfriarse, la mezcla se diluyó con MeOH y se purificó sobre prep-LCMS (pH = 2 condiciones) para dar el produco deseado como sal de TFA (4,1 mg, 22%). LCMS calculada para C₂₁H₂₃F₃ N₉O (M+H)⁺:m/z = 474,2; Encontrado: 474,0.

Ejemplo 10. 5-[3-(cianometilo)-3-(3-metilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida**Paso 1: *tert*-butilo-4-bromo-1H-pirazol-1-carboxilato de metilo**

Este compuesto se preparó usando procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 1, Paso 6 partiendo de 4-bromo-1H-pirazol. LCMS calculada para C₄H₄BrN₂O₂ (M-55)⁺:m/z = 191,0; Encontrado: 190,9

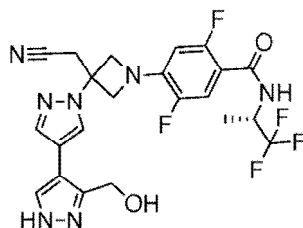
Paso 2: 5-[3-(cianometilo)-3-(3-metilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida

50 Este compuesto se preparó como sal de TFA mediante el uso de procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 4, Etapa 6 a partir de *tert*-butilo-4-bromo-1H-pirazol-1-carboxilato de etilo y 5-[3-(cianometilo)-3-[3-metilo-4-(4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo]-N-isopropilpirazina-2-carboxamida. LC- MS calculado para C₂₀ H₂₄N₉O (M+1)⁺:m/z = 406,2; Encontrado: 406,1.

Ejemplo 11. 5-[3-(cianometilo)-3-(3-etilo-1H, 1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-eN-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiletilo]pirazina-2-trifluoroacetato de carboxamida

Este compuesto se preparó como sal de TFA mediante el uso de procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 4, Paso 6 a partir de 5-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5 tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]pirazina-2-carboxamida (Ejemplo 1, Etapa 5) y 4-bromo-3-etilo-1H-pirazol. LCMS calculada para $C_{21}H_{23}F_3N_9O$ (M+1)⁺:m/z = 474,2; Encontrado: 474,0.

Ejemplo 12. 4-{3-(cianometilo)-3-[3'-(hidroximetilo)-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida



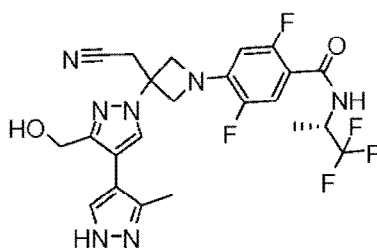
Paso 1: (4-Bromo-1H-pirazol-5-ilo)metanol

Se añadió tetrahidrobórato de sodio (0,13 g, 3,4 mmol) a una solución de 4-bromo-1H-pirazol-5-carbaldehído (0,30 g, 1,7 mmol, de Maybridge) en tetrahidrofurano (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 1 h. La mezcla de reacción se inactivó con NaHCO₃ acuosa saturada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto que se usó directamente en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional. LCMS calculada para $C_4H_6BrN_2O$ (M+1)⁺:m/z = 177,0; Encontrado: 176,9.

Paso 2: 4-{3-(cianometilo)-3-[3'-(hidroximetilo)-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

Este compuesto se preparó como sal de TFA mediante el uso de procedimientos análogos a los descritos para la síntesis del Ejemplo 4, Paso 6 partiendo de 4-{3-(cianometilo)-3-[4-(4,4,5,5 tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-1H-pirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2 trifluoro-1-metiloetilo]benzamida y (4-bromo-1H metanol-pirazol-3-ilo). LCMS calculada para $C_{22}H_{21}F_5N_7O_2$ (M+1)⁺:m/z = 510,2; Encontrado: 510,0.

Ejemplo 13. 4-13-(cianometilo)-3-[3-(hidroximetilo)-3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida



Paso 1. Etilo 4-bromo-1-{3-(cianometilo)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo)amino)carbonilo]fenilo]azetidina-3-ilo}-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo

Se añadieron a un vial de microondas de alcohol isopropílico (10 mL), acetato de 4-bromo-1H-pirazol-3-carboxilato de metilo (de ChemBridge) (788 mg, 3,60 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (48,9 µl, 0,327 mmol) y 4-[3-(eno cianometilo)-azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2 trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (del Ejemplo 4 Paso 4, 1,13 g, 3,27 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 2 h. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a vacío. El residuo se purificó con cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo 0-35% en hexanos) para dar el producto deseado en forma de espuma blanca. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,61 (s, 1H), 8,47 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 12,5 y 6,3 Hz, 1H), 6,62 (dd, J = 11,9 y 7,3 Hz, 1H), 4,76 (dt, J = 15,5 y 7,8 Hz, 1H), 4,61 (d, J = 9,2 Hz, 2H), 4,39 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,32 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,68 (s, 2H), 1,31 (m, 6H) ppm. LCMS calculada para $C_{21}H_{20}BrF_5N_5O_3$ (M+H)⁺:m/z = 564,1; Encontrado: 563,8.

Paso 2. 1- {3-(cianometilo)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo)amino)carbonilo)fenilo]azetidina-3-il}-3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazole-3-carboxilato de metilo

5 A un vial de microondas se cargó con *tert*-alcohol de butilo (1,2 mL), y agua (1,2 mL), fluoruro de cesio (683 mg, 4,50 mmol), acetato de 4-bromo-1-{3-(cianometilo)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo)amino)carbonilo)fenilo]azetidina-3-ilo}-1H-pirazol-3-carboxilato (725 mg, 1,28 mmol) y (4,4,5,5-tetrametilo-1,3,2-dioxaborolan-2-ilo)-13-metilo-4-H-pirazol (401 mg, 1,93 mmol), seguido de EP-127 (49 mg, 0,064 mmol) (de Johnson Mathew). La mezcla de reacción se calentó a 85°C durante 48 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, concentrado. El residuo resultante se purificó con cromatografía ultrarrápida (eluyendo con acetato de etilo al 30-100% en hexanos) para dar el producto deseado como un aceite. LCMS calculada para C₂₅H₂₅F₅N₇O₃ (M+H)⁺:m/z = 566,2; Encontrado: 566,0.

15 **Paso 3.** 4-{3-(cianometilo)-3-[3-(hidroximetilo)-3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo]azetidina-1-ilo}-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida

20 A una solución de etilo de 1-{3-(cianometilo)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo)amino)carbono-ilo)fenilo]azetidina-3-ilo}-3'-metilo-1H,1'H-4,4'-bipirazole-3-carboxilato (35 mg, 0,062 mmol) en THF (0,5 mL) se añadió 2,0 M de tetrahidrobórato de litio en THF (0,12 mL, 0,25 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó con agua lentamente. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró. El residuo resultante se purificó con prep-LCMS (columna XBridge C18, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo/agua que contenía hidróxido de amonio al 0,1%, a un caudal de 60 mL/min) para dar el producto deseado. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,79-7,68 (m, 2H), 7,61 (s, 1H), 6,65 (m, 1H), 6,20 (m, 1H), 4,99-4,89 (m, 1H), 4,68 (s, 2H), 4,60 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,45 (dd, J = 8,9 y 2,0 Hz, 2H), 3,38 (s, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,41 (d, J = 7,0 Hz, 3H). LCMS calculada para C₂₃H₂₃F₅N₇O₂ (M+H)⁺:m/z = 524,2; Encontrado: 524,0.

30 **Ejemplo 14.** 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (Procedimiento 1)

35 A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (24,8 mg, 0,0489 mmol) se añadió etanol (0,3 mL) y la mezcla se agitó para formar una clara solución. Se añadió ácido fosfórico en isopropanol (0,064 mL, 1 M, 0,064 mmol, 1,3 eq.) y la mezcla se agitó durante 2 minutos para formar una suspensión. Esta suspensión se agitó continuamente durante la noche. Esta mezcla se filtró, y la torta del filtro se lavó con metilo *tert*-butilo éter (MTBE). La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (26,3 mg, 88,9%). El patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) se determinó para la sal de ácido fosfórico y se muestra en la Figura 1. Se proporciona una lista de los picos de 2-theta en la Tabla 2 a continuación.

40

45

50

55

60

65

Tabla 2

2-Theta	Altura	H%
6,848	841	64,7
8,225	135	10,4
11,778	214	16,5
12,854	378	29,1
13,577	543	41,7
14,741	157	12,1
15,967	589	45,3
16,557	1061	81,6
17,425	216	16,6
18,021	299	23
19,907	1139	87,6
20,791	1300	100
21,267	248	19,1
22,556	168	12,9
23,77	949	73
24,667	716	55,1
25,698	913	70,2
26,159	434	33,4
27,392	140	10,8
28,647	199	15,3
29,667	251	19,3
30,411	333	25,6
31,213	141	10,9
32,115	84	6,5
32,893	170	13,1
33,572	109	8,4
34,449	108	8,3
35,264	82	6,3
35,741	78	6
36,709	170	13,1
37,381	103	7,9
38,828	63	4,9
39,443	117	9
40,559	88	6,8
41,227	88	6,8
43,396	61	4,7
44.1	90	6,9

Ejemplo 15.4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (Procedimiento 2)

A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (24,6 mg, 0,0485 mmol) se añadió acetonitrilo (0,3 mL) y la mezcla se agitó para formar una clara solución. El ácido fosfórico en isopropanol (0,063 mL, 1 M, 0,063. Mmol 1,3 eq) se añadió y la mezcla se agitó durante 2 h para formar una suspensión, que después se agitó de forma continua durante la noche. Esta mezcla se filtró, y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (26,27 mg, 89,5%). El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido fosfórico y se muestra en la Figura 2. Se proporciona una lista de los picos de 2-theta en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

	2-Theta	Altura	H%
5	6,884	499	54,1
	8,305	90	9,7
	11,868	165	17,9
	12,945	302	32,8
10	13,685	411	44,6
	14,831	125	13,6
	16,116	368	40
	16,656	818	88,8
	17,528	184	19,9
15	18,135	278	30,1
	20,003	845	91,7
	20,898	921	100
	21,335	178	19,3
	22,409	139	15,1
20	22,701	135	14,6
	23,894	711	77,2
	24,796	535	58,1
	25,821	778	84,4
25	26,266	245	26,6
	27,483	122	13,2
	28,742	160	17,4
	29,761	208	22,6
	30,539	237	25,7
30	31,331	111	12
	32,176	55	5,9
	33,026	134	14,5
	33,714	88	9,5
35	34,542	69	7,5
	35,263	60	6,5
	35,829	48	5,3
	36,838	108	11,8
	37,369	64	7
40	38,956	53	5,8
	39,631	89	9,7
	40,7	75	8,2
	41,298	71	7,7
45	43,504	54	5,9
	44,228	76	8,3

Ejemplo 16. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (Procedimiento 3)

50 A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (98,93 mg, 0,195 mmol) se añadió isopropanol (1,23 mL) y la mezcla se agitó para formar una clara solución. Se añadió ácido fosfórico en isopropanol (0,273 mL, 1 M, 0,273 mmol, 1,4 eq.) Y la mezcla se agitó durante 1 h a 70°C para formar una suspensión. Esta suspensión se enfría a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Esta mezcla se filtró, y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (109,1 mg, 92,4%). El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido fosfórico y se muestra en la Figura 3. Se proporciona una lista de los picos de 2-theta en la Tabla 4 a continuación.

60

65

Tabla 4

	2-Theta	Altura	H%
5	6,856	1268	100
	8,237	133	10,5
	11,765	209	16,5
	12,859	343	27
10	13,596	472	37,2
	14,74	127	10
	15,931	403	31,8
	16,569	912	72
15	17,425	177	13,9
	17,964	80	6,3
	18,495	117	9,2
	19,926	876	69
	20,783	865	68,2
20	21,274	197	15,6
	22,561	152	12
	23,727	634	50
	24,637	370	29,2
	25,706	443	35
25	26,157	290	22,9
	27,597	117	9,3
	28,627	120	9,5
	29,682	151	11,9
30	30,389	186	14,6
	31,186	103	8,1
	32,128	55	4,3
	32,872	98	7,7
	33,483	72	5,7
35	34,435	87	6,8
	35,257	42	3,3
	35,742	56	4,4
	36,667	95	7,5
40	37,413	84	6,7
	39,574	56	4,4
	41,182	60	4,8
	44,124	64	5

45 **Ejemplo 17. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (Procedimiento 4)**

50 *Paso 1 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H-4,4-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (crudo)*

55 A una solución clara de 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (405,0 g, 798,1 mmol) en metanol (520,0 mL) e isopropanol (2550,0 mL) a 50°C se añadió una solución acuosa de ácido fosfórico al 85% (119,65 g, 1037,8 mmol) en isopropanol (120,0 mL) durante 18 minutos para formar una suspensión. La suspensión resultante se agitó a 50°C durante 1 h. *n*-heptano (4050,0 mL) se añadió luego a la suspensión durante 40 min, manteniendo la temperatura interna de la suspensión entre 46 a 53°C. Después de la adición de *n*-heptano, la suspensión se enfrió gradualmente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con una mezcla de isopropanol y *n*-heptano (3: 10 en volumen, 2 x 700 mL) seguido de *n*-heptano (3 x 550 mL) y se secó bajo vacío a temperatura ambiente para permitirse 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (434,6 g, 89,9% de rendimiento).

60 *Paso 2 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido fosfórico (purificada)*

65

[0342] En un matraz de fondo redondo de 22 L equipado con un mecanismo de agitación superior y se añadió un termopar revestido de teflón 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1 S)2,2,2-trifluor-1-metiloetilo] ácido fosfórico benzamida sal del Paso 1 (958,3 g, 1,583 mmol) y metanol (MeOH, 9.583,0 mL) a temperatura ambiente. La suspensión resultante se calentó a 50°C para dar un claro, solución de color naranja claro. La solución se filtró por pulido, se transfirió de nuevo al matraz de 22 L y se calentó a reflujo para destilar metanol (4,793 g, 6,090 mL) durante 70 min. A continuación, se añadió isopropanol (7700 mL) al matraz durante 30 min mientras se mantiene la temperatura de la solución entre 50 a 65°C. Después de la adición completa de isopropanol, *n* se añadió en porciones heptano (14 400 mL) mientras se mantiene una destilación suave de la mezcla de disolventes (MeOH, IPA y *n*-heptano) durante 2,5 h. Se eliminó por destilación un total de 10818 g (15.000 mL) de la mezcla de disolventes. La suspensión resultante se enfrió gradualmente a temperatura ambiente, y se agitó a temperatura ambiente durante 17 h. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavó con una mezcla de isopropanol y *n*-heptano (1: 5 en volumen, 3000 mL) seguido de *n*-heptano (3 x 4000 mL), y se secó bajo vacío a temperatura ambiente para proporcionar el título compuesto como un polvo blanquecino cristalino (925,7 g, 96,6% de rendimiento).

La sal de ácido fosfórico ha demostrado ser una sal 1:1 por ¹H RMN y la cristalinidad fue confirmada por XRPD. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,35 (br s, 4H), 8,50 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,34 (dd, *J* = 12,5, 6,4 Hz, 1H), 6,61 (dd, *J* = 12,0, 7,4 Hz, 1H), 4,86-4,69 (m, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 4,38 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 3,64 (s, 2H), 2,21 (s, 6H), 1,30 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- *d*₆) δ 162,8, 156,7 (d, *J*_{CF} = 246,5 Hz), 146,9 (d, *J*_{CF} = 236,1 Hz), 141,6 (dd, *J*_{CF} = 13,0, 11,7 Hz), 140,3, 138,3, 125,8 (q, *J*_{CF} = 281,8 Hz), 125,6, 117,2, 116,4 (dd, *J*_{CF} = 22,3, 4,6 Hz), 115,1, 111,3 (dd, *J*_{CF} = 15,7, 5,8 Hz), 107,7, 102,0 (dd, *J*_{CF} = 29,5, 4,5 Hz), 62,3, 57,7, 57,7, 45,8 (q, *J*_{CF} = 30,5 Hz), 27,0, 13,3 (d, *J*_{CF} = 1,7 Hz), 11,7. C₂₃H₂₂F₅N₇O (Calc MW 507,46.); LCMS: (EI) *m/e* 508,1 (M⁺+H). DSC mostró un pico de fusión definido a aproximadamente 227,62°C (comienzo a 224,45°C) como se muestra en la Figura 4A. El compuesto del título mostró una pérdida de peso de 0,129% hasta 200°C como se muestra en la Figura 4B. El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido fosfórico y se muestra en la Figura 4C. Una lista de los picos 2-theta se proporciona en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

2-Theta	Altura	H%
6,805	8160	100
7,278	56	0,7
8,164	230	2,8
11,065	68	0,8
11,685	1060	13
12,798	260	3,2
13,512	920	11,3
14,667	110	1,3
15,923	686	8,4
16,49	2186	26,8
17,022	236	2,9
17,292	111	1,4
17,991	137	1,7
18,448	703	8,6
19,827	1407	17,2
20,677	2119	26
21,236	199	2,4
22,079	275	3,4
22,421	406	5
23,592	2119	26
24,635	424	5,2
25,317	296	3,6
25,64	674	8,3
26,161	363	4,5
27,284	94	1,2
27,989	198	2,4
28,628	118	1,4
29,63	135	1,7
30,419	455	5,6
32,099	60	0,7
32,832	148	1,8
33,346	166	2
34,436	447	5,5

2-Theta	Altura	H%
35,711	117	1,4
36,719	295	3,6
37,349	135	1,7
38,802	53	0,6
39,585	108	1,3
40,565	64	0,8
41,224	260	3,2
42,44	68	0,8

Ejemplo 18.4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido clorhídrico (Procedimiento 1)

A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (97,64 mg, 0,192 mmol) se añadió 2-butanol (1,2 mL) y la mezcla se agitó durante 2 min para dar una solución clara. Se añadió ácido clorhídrico en isopropanol/acetato de isopropilo (0,29 mL, 1 M en IPA/IPAc de 3,7 M HCl en IPAc, 0,29 mmol, 1,5 eq.) Para dar una solución clara. Esta solución se agitó durante 6 min para formar una suspensión. Esta suspensión se agitó entonces a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, la suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó bajo vacío durante 12 horas a 45-50°C para proporcionar la sal del título (97,8 mg, 93,4%). DSC mostró un pico de fusión definido a aproximadamente 213,07°C (comienzo a 209,22°C) como se muestra en la Figura 5A. El compuesto del título mostró una pérdida de peso de 4,635% hasta aproximadamente 210°C como se muestra en la Figura 5B. El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido clorhídrico y se muestra en la Figura 5C. Una lista de los picos 2-theta se proporciona en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

2-Theta	Altura	H%
7,067	208	38
12,234	289	53
13,716	308	56,4
14,48	133	24,4
14,784	295	54
15,459	289	52,9
16,259	181	33,1
16,609	359	65,7
17,121	347	63,5
19,486	129	23,5
20,439	147	27
21,259	95	17,4
22,865	223	40,8
23,857	335	61,3
24,771	546	100
25,704	204	37,4
26,496	284	51,9
27,429	334	61,1
28,354	194	35,6
28,71	106	19,3
31,472	70	12,8
31,84	117	21,4
34,09	117	21,5
40,551	58	10,6
41,48	75	13,8
44,075	53	9,7

Ejemplo 19. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido clorhídrico (Procedimiento 2)

A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H 4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-

trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (52,12 mg, 0,103 mmol) se añadió isopropanol (0,5 mL) y la mezcla se agitó durante 3 min para formar una solución clara. El ácido clorhídrico en isopropanol/acetato de isopropilo (0,144 mL, 1 M en IPA/IPAc de 3,7 M HCl en IPAc, 0,144 mmol, 1,4 eq.) se añadió luego, dando como resultado una solución clara. Esta solución transparente se agitó durante 6-8 minutos para formar una suspensión. Esta suspensión se agitó entonces a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, la suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (51,2 mg, 91,6%). El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido clorhídrico y se muestra en la Figura 6. Se proporciona una lista de los picos de 2-theta en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

2-Theta	Altura	H%
6,967	164	47,1
12,082	267	76,8
13,388	202	58
13,71	150	43,1
14,831	101	29,1
15,438	97	27,9
16,243	174	50,1
16,634	348	100
16,97	189	54,2
17,576	76	21,8
19,672	96	27,5
20,758	141	40,6
21,163	94	27,1
22,879	110	31,7
23,928	115	33
24,735	128	36,8
25,097	149	42,9
26,444	120	34,4
26,767	112	32,2
27,416	147	42,3
28,344	105	30,2
28,686	105	30,2
29,508	58	16,7
30,156	67	19,2
31,853	50	14,3
41,126	44	12,7

Ejemplo 20. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida sal de ácido bromhídrico

A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (54,74 mg, 0,108 mmol) se añadió isopropanol (0,6 mL) y la mezcla se agitó durante 3 min a dar una solución clara. Se añadió ácido bromhídrico en isopropanol/agua (0,151 mL, 1 M IPA/agua de 48% de HBr en agua, 0,144 mmol, 1,4 eq.), Dando como resultado una solución transparente, que después se agitó durante aproximadamente 8 minutos para formar una suspensión. Esta suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, la suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (53,12 mg, 83,7%). DSC mostró un pico de fusión definido a aproximadamente 203,19°C (comienzo a 199,26°C) como se muestra en la Figura 7A. El compuesto del título mostró sólo una ligera pérdida de peso hasta aproximadamente 100°C como se muestra en la Figura 7B. El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido bromhídrico y se muestra en la Figura 7C. Una lista de los picos 2-theta se proporciona en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

2-Theta	Altura	H%
7,007	254	36,6
12,179	139	20,1
12,445	116	16,8
13,468	86	12,4
14,377	297	42,9
15,042	65	9,4
15,622	192	27,6
16,211	140	20,1
17,051	281	40,5
17,407	87	12,5
18,5	62	8,9
19,583	121	17,5
20,222	308	44,4
21,104	347	50
22,821	376	54,2
23,484	338	48,8
23,663	137	19,8
24,279	137	19,8
24,889	693	100
25,425	171	24,7
25,99	76	11
26,62	203	29,3
27,095	330	47,6
27,483	116	16,7
28,208	382	55,1
28,572	159	22,9
29,801	134	19,3
30,33	89	12,8
31,278	160	23
31,971	66	9,5
33,731	118	17,1
34,608	103	14,8
35,638	68	9,8
36,746	111	16
38,497	72	10,3
39,297	112	16,2
40,476	98	14,2
41,364	169	24,4
43,37	68	9,8
43,804	60	8,7

50 **Ejemplo 21. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1metiloetilo]benzamida sal de ácido sulfúrico (Procedimiento 1)**

55 A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (47 mg, 0,103 mmol) se añadió isopropanol (0,5 mL) y la mezcla se agitó durante 3 min a dar una solución clara. Se añadió ácido sulfúrico en isopropanol (0,5 M en IPA a partir de ácido sulfúrico al 98%, 0,051 mmol, 0,55 eq.). Dando como resultado una solución transparente, que después se agitó durante 6-8 minutos para formar una suspensión. Esta suspensión se agitó entonces a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, la suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con MTBE. La torta del filtro se secó al aire para dar la sal del título (18,84 mg, 33,6%). DSC mostró dos endotermias a 136,16°C y 146,97°C (comienzo a 122,15°C) y una endotermia estrecha a 259,16°C (comienzo a 255,09°C) como se muestra en la Figura 8A. El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido sulfúrico y se muestra en la Figura 8B. Una lista de los picos 2-theta se proporciona en la Tabla 9 a continuación.

65

Tabla 9

2-Theta	Altura	H%
3,742	151	18,4
7,322	228	27,7
9,892	93	11,3
12,57	74	9
13,642	56	6,8
14,713	341	41,4
16,307	81	9,8
17,412	60	7,3
18,978	125	15,2
19,628	823	100
20,982	73	8,9
21,256	212	25,8
22,041	66	8
24,625	691	84
25,902	66	8
26,529	123	15
27,083	174	21,1
28,18	175	21,2
30,706	91	11,1
32,369	53	6,4
34,766	96	11,6
38,298	50	6
38,663	74	9
42,485	48	5,8

Ejemplo 22. 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H, 1'H 4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida ácido sulfúrico sal (Procedimiento 2)

A 4-[3-(cianometilo)-3-(3',5'-dimetilo-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-ilo)azetidina-1-ilo]-2,5-difluoro-N-[(1S)2,2,2-trifluoro-1-metiloetilo]benzamida (27,91 mg 0,055 mmol) se añadió isopropanol (0,5 mL) para formar una solución clara. Se añadió ácido sulfúrico en agua (1,0 M, 0,06 mmol, 1,09 eq.) y la mezcla resultante se agitó para formar una suspensión. Esta suspensión se calentó a 60°C y se agitó para dar una solución clara. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se agitó continuamente durante la noche. La mezcla resultante se filtró y la torta del filtro se lavó con MTBE. A continuación, la torta del filtro se secó para dar la sal del título. El patrón de XRPD se determinó para la sal de ácido sulfúrico y se muestra en la Figura 9. Se proporciona una lista de los picos de 2-theta en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10

2-Theta	Altura	H%
4,843	191	22,5
7,313	218	25,8
9,856	116	13,7
12,556	95	11,2
13,61	57	6,8
14,703	361	42,6
15,261	64	7,5
16,309	147	17,3
18,941	149	17,6
19,611	847	100
20,952	113	13,3
21,242	241	28,4
21,708	100	11,8
24,609	620	73,2
26,513	130	15,3

2-Theta	Altura	H%
27,026	126	14,8
28,19	167	19,7
30,659	86	10,1
32,346	60	7
34,711	108	12,7
38,597	82	9,7
41,082	55	6,4
42,435	43	5,1

Ejemplo A: Ensayo de quinasa JAK *In vitro*

Los compuestos en el presente documento se ensayaron para la actividad inhibidora de dianas JAK de acuerdo con el siguiente ensayo *in vitro* descrito en Park et al., Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104. Los dominios catalíticos de JAK1 humana (a.a. 837-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) y JAK3 (a.a. 781-1124) con una etiqueta N-terminal de His se expresaron usando baculovirus en células de insecto y se purificaron. La actividad catalítica de JAK1, JAK2 o JAK3 se ensayó midiendo la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado se detectó por fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF). Cl_{50} s de los compuestos se midieron para cada quinasa en las 40 reacciones microL que contienen la enzima, ATP y péptido 500 nM en Tris 50 mM (pH 7,8) tampón con NaCl 100 mM, DTT 5 mM, y 0,1 mg/mL (0,01 %) BSA. Para las mediciones 1 mM Cl_{50} , la concentración de ATP en las reacciones era de 1 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se detuvieron con 20 μ l de EDTA 45 mM, 300 nM SA-APC, 6 nM Eu-PY20 en tampón de ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). La unión al anticuerpo marcado con europio se llevó a cabo durante 40 minutos y la señal de HTRF se midió en un lector de placa de fusión (Perkin Elmer, Boston, MA). Véase la Tabla 11 para los datos relacionados con los compuestos de los ejemplos.

Tabla 11. Datos Cl_{50} para el ensayo de enzima JAK (a 1 mM ATP)

Nº de Ejemplo	JAK1 Cl_{50} (nM)*	JAK2 Cl_{50} (nM)*	JAK2/JAK1
1	+	++++	> 10
2	+	++	> 10
3	+	+++	> 10
4	+	++	> 10
5	++	+++	> 10
6	+	+++	> 10
7	+	++	> 10
8	+	++	> 10
9	+	++	> 10
10	++	+++	
11	++	+++	
12	++	+++	
13	+	+++	> 10
17	+	++	> 10

* 300 nM o menos (+); > 300 nM a 1,000 nM (++); > 1000 nM (+++); > 700 nm (++++)

Ejemplo B: Ensayos celulares

Líneas celulares de cáncer dependientes de citocinas y por lo tanto la transducción de señal JAK/STAT, para el crecimiento, pueden sembrarse a 6000 células por pocillo (formato de placa de 96 pocillos) en RPMI 1640, 10% de FBS, y 1 ng/ml de citoquina apropiada. Los compuestos se pueden añadir a las células en DMSO/media (concentración final 0,2% de DMSO) y se incubaron durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. El efecto del compuesto sobre la viabilidad celular se evaluó a través del ensayo de viabilidad de célula luminescente de CellTiter-Glo (Promega) seguido de cuantificación TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Efectos potencialmente fuera de objetivo de los compuestos se miden en paralelo usando una línea celular impulsada no JAK con la misma lectura del ensayo. Todos los experimentos se llevan a cabo típicamente por duplicado.

Las líneas celulares anteriores también se pueden utilizar para examinar los efectos de los compuestos sobre la fosforilación de las quinasas JAK o posibles sustratos aguas abajo tales como proteínas STAT, Akt, Shp2, o Erk. Estos experimentos se pueden realizar después de una inanición de citoquinas durante la noche, seguido de una breve preincubación con el compuesto (2 horas o menos) y la estimulación de citoquinas de aproximadamente 1 hora o menos. Las proteínas se extrajeron a continuación a partir de células y se analizaron mediante técnicas familiares para los versados en la técnica incluyendo blotting o ELISA utilizando anticuerpos que pueden diferenciar entre la proteína forilada y el total de fosfatasa Western. Estos experimentos pueden utilizar células normales o cancerosas para investigar la actividad de los compuestos sobre biología de supervivencia de células tumorales o en mediadores de la enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, con respecto a este último, citoquinas tales como IL-6, IL-12, IL-23, o IFN se pueden utilizar para estimular la activación de JAK resulta en la fosforilación de la proteína STAT y potencialmente en perfiles de transcripción (evaluada por matriz o tecnología qPCR) o la producción y/o secreción de proteínas, tales como IL-17. La capacidad de los compuestos para inhibir estos efectos mediados por citoquinas se puede medir usando técnicas comunes para los versados en la técnica.

Los compuestos en el presente documento también pueden ser examinados en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad contra JAK mutantes, por ejemplo, la mutación JAK2V617F encontrada en trastornos proliferativos mieloides. Estos experimentos a menudo utilizan células de citoquinas dependientes de linaje hematológico (por ejemplo BAF/3) en el que el tipo salvaje o quinasas mutantes JAK se expresan ectópicamente (James, C., et al Nature 434: 1144-1148; Staerk, J., et al. JBC 280: 41.893-41.899). Los puntos finales incluyen los efectos de los compuestos sobre la supervivencia celular, la proliferación, y las proteínas JAK, STAT, Akt, o Erk fosforiladas.

Ciertos compuestos en este documento pueden evaluarse para determinar su actividad inhibitoria de la proliferación de células T. Tal ensayo se puede considerar un ensayo de proliferación accionado por segunda citoquina (*i.e.* JAK) y también un ensayo simplista de la supresión inmune o inhibición de la activación inmune. Lo siguiente es un breve resumen de cómo pueden llevarse a cabo tales experimentos. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se preparan a partir de muestras de sangre completa humana utilizando el método de separación Ficoll Hypaque y células T (fracción 2000) pueden obtenerse a partir de PBMCs por elutriación. Células T humanas recién aisladas pueden ser mantenidas en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) a una densidad de 2×10^6 células/ml a 37°C para un máximo de 2 días. Para análisis de proliferación celular estimulada IL-2, células T se tratan primero con fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 10 µg/ml durante 72 horas. Después de lavarse una vez con PBS, 6000 células/pocillo se aplicaron a placas de 96 pocillos y se trataron con compuestos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo en presencia de 100 U/ml IL-2 humana (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Las placas se incuban a 37°C durante 72 h y el índice de proliferación se evaluó a través de reactivos de CellTiter-Glo luminiscentes de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante (Promega; Madison, WI).

Ejemplo C: Eficacia antitumoral *in vivo*

Los compuestos en el presente documento pueden evaluarse en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones inmunocomprometidos. Por ejemplo, una variante tumorigénica de la línea celular de plasmacitoma INA-6 puede utilizarse para inocular ratones SCID por vía subcutánea (Burger, R., et al Hematol J. 2: 42-53,2001). Animales portadores de tumores pueden entonces ser asignados al azar en grupos de tratamiento de fármacos o vehículo y diferentes dosis de los compuestos se pueden administrar por cualquier número de las rutas habituales incluyendo oral, ip, o infusión continua utilizando bombas implantables. El crecimiento tumoral se siguió con el tiempo usando calibradores. Además, las muestras de tumor pueden ser extraídas en cualquier momento después de la iniciación del tratamiento para el análisis como se describe anteriormente (Ejemplo B) para evaluar los efectos del compuesto sobre la actividad de JAK y las vías de señalización corriente abajo. Además, la selectividad del compuesto puede evaluarse usando modelos de tumores de xenoinjerto que son impulsados por otras quinasas conocidas (por ejemplo, Bcr-Abl), tales como el modelo de tumor K562.

Ejemplo D: Prueba de respuesta de hipersensibilidad retardada de contacto con la piel murina

Los compuestos en el presente documento también pueden ser examinados por sus eficacias (de inhibir dianas JAK) en el modelo de prueba de hipersensibilidad retardada murino impulsado de células T. La respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de contacto con la piel murina se considera que es un modelo válido de dermatitis de contacto clínica, y otros trastornos del sistema inmune de la piel mediados por linfocitos T, tales como psoriasis (Immunol Today. 1998 Ene. 19 (1):37-44). DTH Murina comparte múltiples características con psoriasis, incluyendo el infiltrado inmune, el aumento acompañante en citoquinas inflamatorias, y la hiperproliferación de queratinocitos. Es más, muchas clases de agentes que son eficaces en el tratamiento de la psoriasis en la clínica también son inhibidores eficaces de la respuesta DTH en ratones (Agents Actions 1993 Ene; 38 (1-2): 116-21.).

[0356] En el Día 0 y 1, los ratones Balb/c se sensibilizaron con una aplicación tópica, a su abdomen afeitado con el antígeno 2,4, dinitro-fluorobenceno (DNFB). El día 5, se mide el espesor de las orejas usando un micrómetro de ingeniero. Esta medición se registra y se utiliza como línea de base. Ambas orejas de los animales a continuación,

son desafiados por una aplicación tópica de DNFB en un total de 20 µl (10 µl en el pabellón auditivo interno y 10 µl en el pabellón auditivo externo) a una concentración de 0,2%. Veinticuatro a setenta y dos horas después del desafío, las orejas se midieron de nuevo. El tratamiento con los compuestos de ensayo se da a lo largo de las fases de sensibilización y estimulación (día-1 a día 7) o antes y durante la fase de desafío (por lo general tarde del día 4 al día 7). El tratamiento de los compuestos de ensayo (en diferentes concentraciones) se administra por vía sistémica o por vía tópica (aplicación tópica del tratamiento para los oídos). Eficacias de los compuestos de ensayo se indican mediante una reducción de la hinchazón de la oreja en comparación con la situación sin el tratamiento. Los compuestos que causan una reducción de 20% o más se consideraron eficaces. En algunos experimentos, los ratones son desafiados pero no sensibilizados (control negativo).

El efecto inhibitor de los compuestos de prueba (activación de las rutas JAK-STAT de inhibición) se puede confirmar mediante análisis inmunohistoquímico. Activación de la ruta JAK-STAT resulta en la formación y la translocación de factores de transcripción funcionales. Además, la afluencia de células del sistema inmune y aumento de la proliferación de queratinocitos también deben proporcionar los cambios de perfil de expresión únicos en el oído que pueden investigarse y cuantificarse. Secciones de oído fijadas con formalina y embebidas en parafina (cosechadas después de la fase de desafío en el modelo DTH) se someten a análisis inmunohistoquímica usando un anticuerpo que interactúa específicamente con STAT3 fosforilado (Clon 58E12, Cell Signaling Technologies). Las orejas de ratón se tratan con los compuestos de ensayo, vehículo o dexametasona (un tratamiento clínicamente eficaz para la psoriasis), o sin ningún tratamiento, en el modelo DTH para las comparaciones. Los compuestos de ensayo y la dexametasona pueden producir cambios transcripcionales similares tanto cualitativa como cuantitativamente, y tanto los compuestos de ensayo como la dexametasona pueden reducir el número de células infiltrantes. Tanto la administración sistémica como la tópica de los compuestos de ensayo pueden producir efectos inhibidores, es decir, reducción en el número de células infiltrantes y la inhibición de los cambios transcripcionales.

Ejemplo E: Actividad anti-inflamatoria *in vivo*

Los compuestos en el presente documento pueden evaluarse en modelos de roedores o no roedores diseñados para replicar una respuesta de inflamación única o complejo. Por ejemplo, modelos de roedores de artritis se pueden utilizar para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos dosificados preventivamente o terapéuticamente. Estos modelos incluyen, pero no se limitan a la artritis de ratón o rata inducida por colágeno, la artritis inducida por adyuvante de la rata, y la artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Las enfermedades autoinmunes que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo I, uveorretinitis, tiroiditis, miastenia grave, nefropatías inmunoglobulina, miocarditis, la sensibilización de las vías respiratorias (asma), lupus, o colitis también se pueden utilizar para evaluar el potencial terapéutico de compuestos del presente documento. Estos modelos están bien establecidos en la comunidad de investigación y son familiares para los versados en la técnica (Current Protocols in Immunology, Vol 3., Coligan, J.E. et al., Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, PG y Willoughby, DA, Humana Press, 2003.).

Ejemplo F: Modelos animales para el tratamiento del ojo seco, uveítis y conjuntivitis

Los agentes pueden ser evaluados en uno o más modelos preclínicos de ojo seco conocidos por los versados en la técnica incluyendo, pero no limitados al modelo de glándula lagrimal de concaivalina de conejo A (ConA), el modelo de ratón de escopolamina (subcutánea o transdérmica), el modelo de la glándula lagrimal de ratón de Botulinum, o cualquiera de una serie de modelos de roedores autoinmunes espontáneos que resultan en disfunción de la glándula ocular (por ejemplo NOD-SCID, MRL/lpr o NZB/NZW) (Barabino et al., Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 y Schrader et al., Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312). Los puntos finales en estos modelos pueden incluir la histopatología de las glándulas oculares y del ojo (Córnea, etc.) y, posiblemente, la prueba clásica Schirmer o versiones modificadas de los mismos (Barabino et al.) que miden la producción de lágrimas. La actividad puede ser evaluada por dosificación a través de múltiples vías de administración (por ejemplo sistémicas o tópicas) que pueden comenzar antes o después de existir la enfermedad medible.

Los agentes pueden ser evaluados en uno o más modelos preclínicos de uveítis conocidos por los versados en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, los modelos de uveítis autoinmune experimental (EAU) y uveítis inducida de endotoxina (EIU). Experimentos de EAU se pueden realizar en el conejo, rata o ratón y pueden implicar la inmunización pasiva o activa. Por ejemplo, cualquiera de un número o antígenos de la retina puede usarse para sensibilizar a los animales a un inmunógeno relevante después de lo cual los animales pueden ser desafiados ocularmente con el mismo antígeno. El modelo EIU es más agudo e implica la administración local o sistémica de lipopolisacárido a dosis subletales. Los puntos finales, tanto para los modelos de la EIU y la EAU pueden incluir examen fundoscópico, histopatología, entre otros. Estos modelos son revisados por Smith et al. (Immunology and Cellular Biology 1998, 76, 497-512). La actividad se evaluó mediante la dosificación a través de múltiples vías de administración (por ejemplo sistémicas o tópicas) que pueden comenzar antes o después de existir enfermedad medible. Algunos modelos mencionados anteriormente, también pueden desarrollar escleritis/epiescleritis, corioditis, ciclitis, o iritis y son por lo tanto útiles en la investigación de la actividad potencial de los compuestos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

Los agentes también se pueden evaluar en uno o más modelos preclínicos de conjuntivitis conocidos por los versados en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, modelos de roedores utilizando cobaya, rata o ratón. Los modelos de cobaya incluyen los que utilizan inmunización activa o pasiva y/o protocolos de reto inmunes con antígenos tales como ovoalbúmina o ambrosía (revisados en Groneberg, DA, et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113). Modelos de rata y de ratón son similares en diseño general a los de la cobaya (también revisados por Groneberg). La actividad puede ser evaluada por dosificación a través de múltiples vías de administración (por ejemplo sistémicas o tópicas) que pueden comenzar antes o después de existir la enfermedad medible. Puntos finales para tales estudios pueden incluir, por ejemplo, histológicos, inmunológicos, bioquímicos, o el análisis molecular de los tejidos oculares tales como el conjuntivo.

Ejemplo G: Protección de hueso *in vivo*

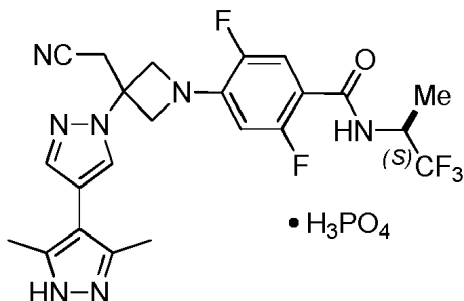
[0362] Los compuestos se pueden evaluar en varios modelos preclínicos de osteopenia, osteoporosis, o la resorción ósea conocida por los versados en la técnica. Por ejemplo, roedores ovariectomizados se pueden usar para evaluar la capacidad de los compuestos para afectar a los signos y los marcadores de la remodelación ósea y/o la densidad (WSS Jee y W. Yao, J Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 1 (3), 193-207). Alternativamente, la densidad ósea y la arquitectura se pueden evaluar en roedores tratados con control o compuestos en modelos de osteopenia (por ejemplo, glucocorticoides) inducida por terapia (Yao, et al Arthritis y Rheumatism, 2008, 58 (6), 3485 a 3497;. Y *ID.* 58 (11), 1674-1686). Además, los efectos de los compuestos sobre la resorción ósea y la densidad pueden ser evaluables en los modelos de roedores de artritis discutidos anteriormente (Ejemplo E). Criterios de valoración para todos estos modelos pueden variar, pero a menudo incluyen evaluaciones histológicas y radiológicas, así como inmunohistología y marcadores bioquímicos adecuados de remodelación ósea.

Ejemplo H: Modelo de ratón transgénico S100A9

Se ha mostrado previamente que ratones transgénicos *S100A9* muestran la acumulación de médula ósea de MDSC acompañada de desarrollo de citopenias multilíneas progresivas y displasia citológica similar a MDS. Además, maduración temprana forzada de MDSC ya sea por tratamiento con ácido retinoico *todo-trans* o por interrupción de proteína adaptadora (DAP12) con motivo (ITAM) de activación de inmunoreceptor activo a base de tirosina de la señalización de CD33 rescató el fenotipo hematológico y mitiga la enfermedad. Este sistema puede ser útil para examinar los efectos sobre la inhibición JAK1 sobre la enfermedad de tipo MDS en un modelo preclínico. J. Clin. Invest, 123 (11): 4.595 a 4.611 (2013), De acuerdo con ello, un inhibidor selectivo JAK1 se dosifica por medio de una sonda oral. Se supervisa la capacidad del compuesto para reducir las citopenias y displasia citológica observada en los ratones transgénicos *S100A9*.

REIVINDICACIONES

1. Una sal que es fosfato de 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidín-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida (Compuesto 1 fosfato) que tiene la fórmula:



2. La sal de la reivindicación 1, que es una relación estequiométrica 1: 1 de 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1'H-[4,4']bipirazolil-1-il)-azetidín-1-il]-2,5-difluoro-N-(2,2,2-trifluoro-1-metil-etil)-benzamida (Compuesto 1) a ácido fosfórico.

3. La sal de las reivindicaciones 1 o 2 que está aislada.

4. Una forma sólida de la sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que la forma sólida es cristalina.

5. La forma sólida de la reivindicación 4 que tiene un pico de XRPD, en términos de 2-theta, a $6,8 \pm 0,2$ grados.

6. La forma sólida de la reivindicación 4, que tiene por lo menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de $6,8 \pm 0,2$, $16,5 \pm 0,2$, $20,7 \pm 0,2$ y $23,6 \pm 0,2$ grados.

7. La forma sólida de la reivindicación 4 que tiene por lo menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $6,8 \pm 0,2$, $16,5 \pm 0,2$, $20,7 \pm 0,2$ y $23,6 \pm 0,2$ grados.

8. La forma sólida de la reivindicación 4 que tiene por lo menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $6,8 \pm 0,2$, $16,5 \pm 0,2$, $20,7 \pm 0,2$, y $23,6 \pm 0,2$ grados.

9. La forma sólida de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que además tiene por lo menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de $11,7 \pm 0,2$, $13,5 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,4 \pm 0,2$ y $19,8 \pm 0,2$ grados.

10. La forma sólida de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que además tiene por lo menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,7 \pm 0,2$, $13,5 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,4 \pm 0,2$ y $19,8 \pm 0,2$ grados.

11. La forma sólida de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que además tiene por lo menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,7 \pm 0,2$, $13,5 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,4 \pm 0,2$ y $19,8 \pm 0,2$ grados.

12. La forma sólida de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que además tiene por lo menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,7 \pm 0,2$, $13,5 \pm 0,2$, $15,9 \pm 0,2$, $18,4 \pm 0,2$ y $19,8 \pm 0,2$ grados.

13. La forma sólida de cualquiera de las reivindicaciones 4-12 que tiene un patrón de XRPD como se muestra en la Figura 4C.

14. La forma sólida de la reivindicación 4, **caracterizada por** un termograma de DSC que tiene un evento endotérmico a $228 \pm 3^\circ$ C.

15. La forma sólida de la reivindicación 14, en la que el evento endotérmico tiene un inicio a $224 \pm 3^\circ$ C.

16. La forma sólida de la reivindicación 4 que tiene un termograma DSC como se muestra en la Figura 4A.

17. La forma sólida de la reivindicación 4 que tiene un termograma TGA como se muestra en la Figura 4B.

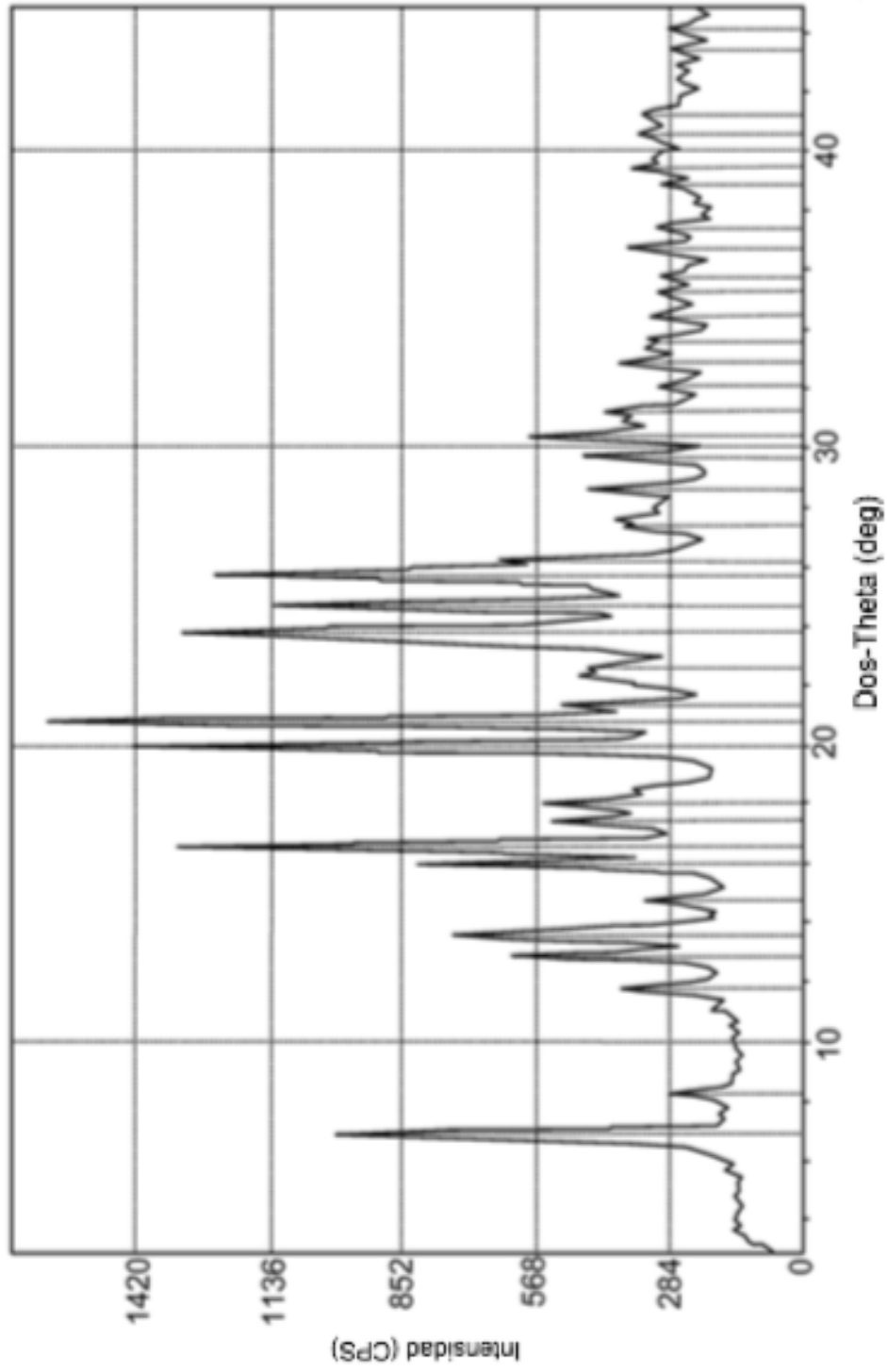


FIG. 1

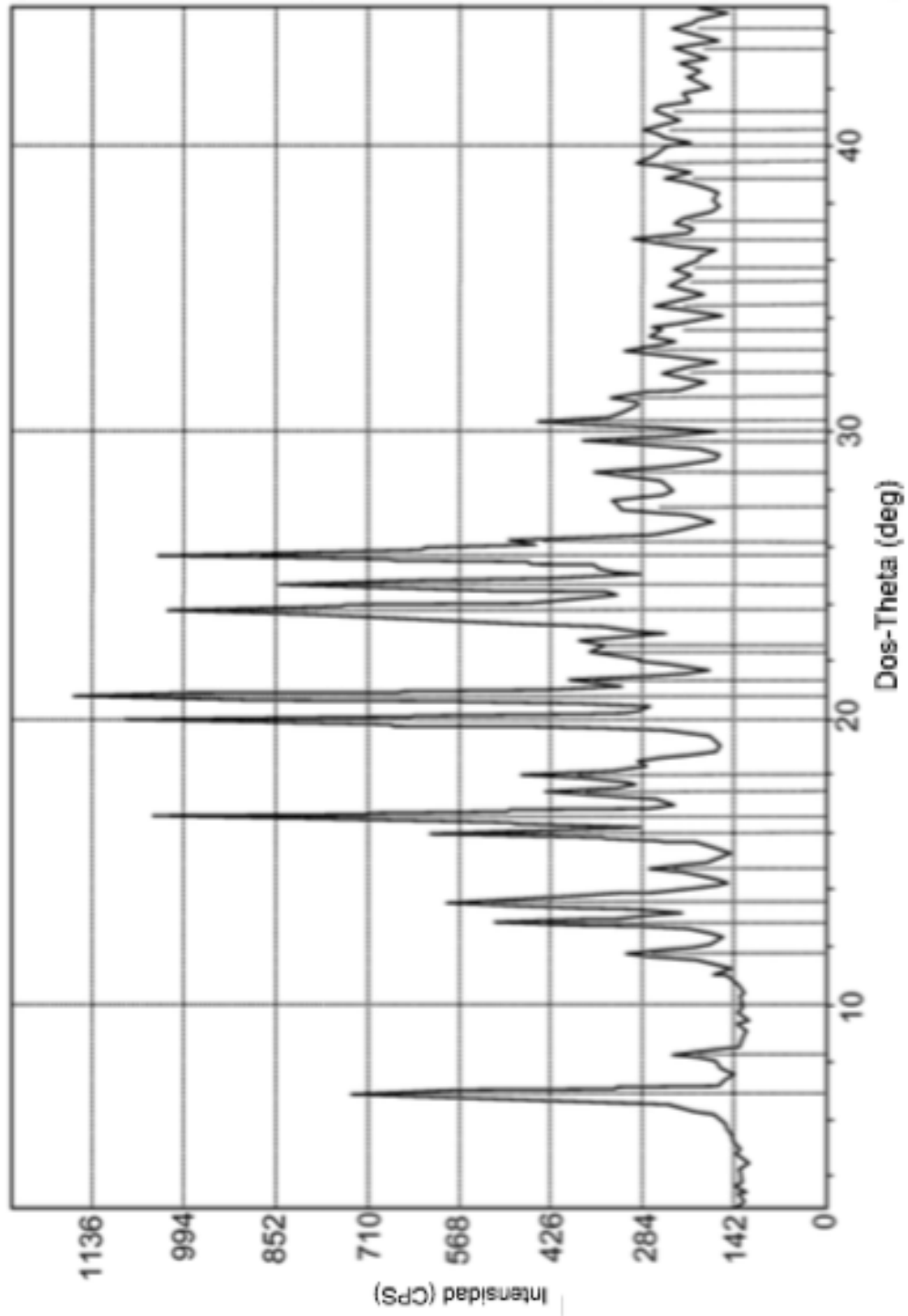


FIG. 2

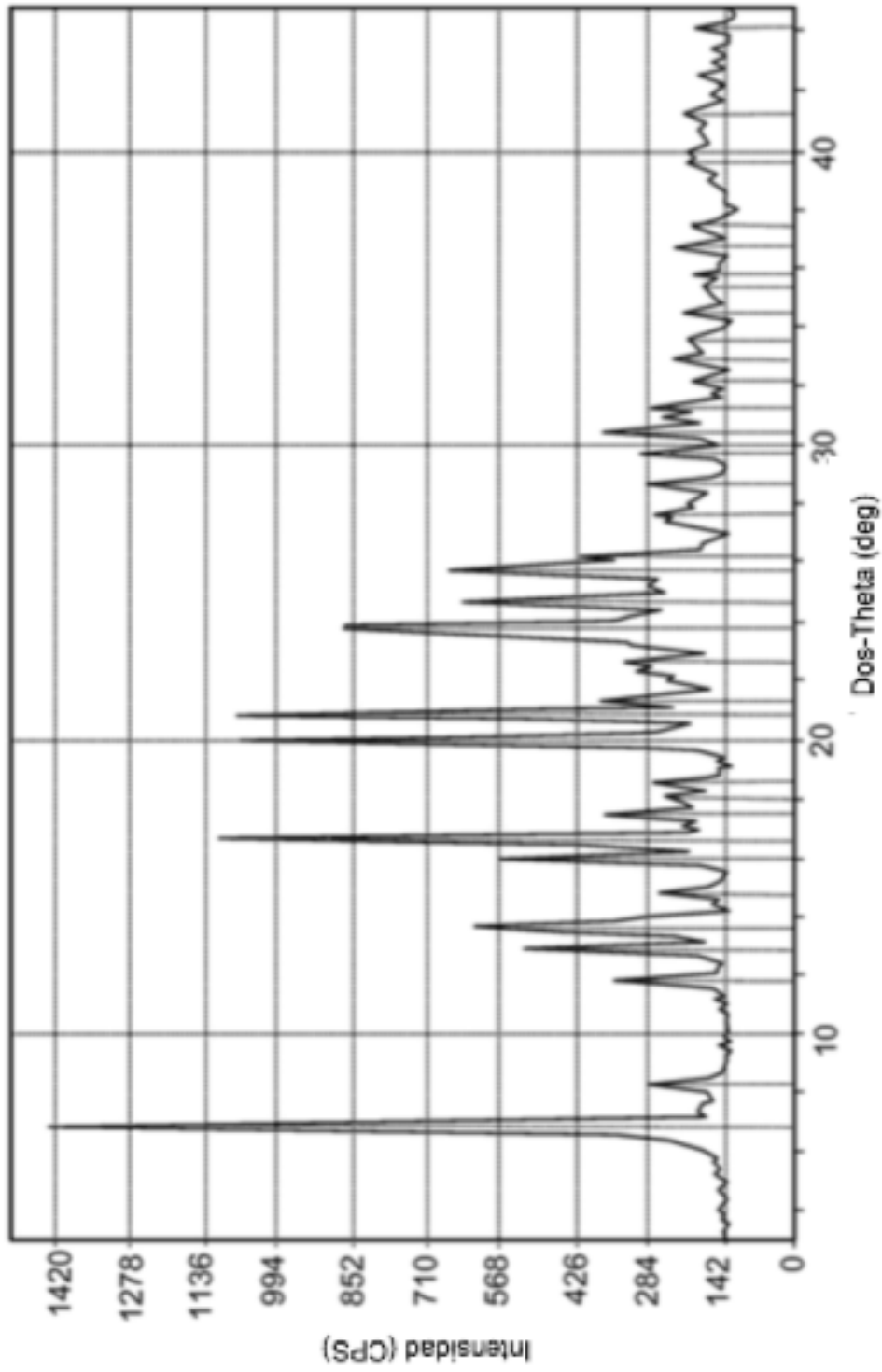


FIG. 3

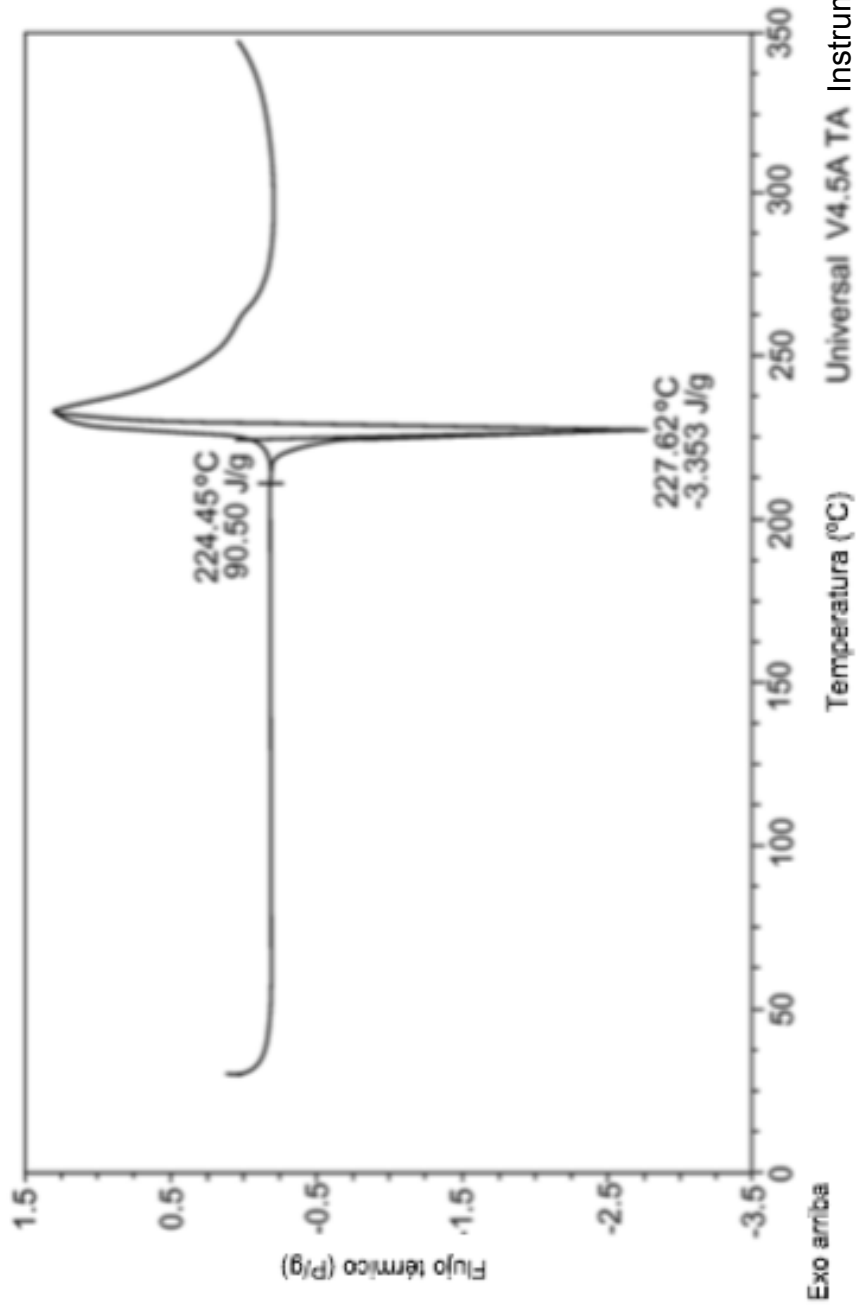
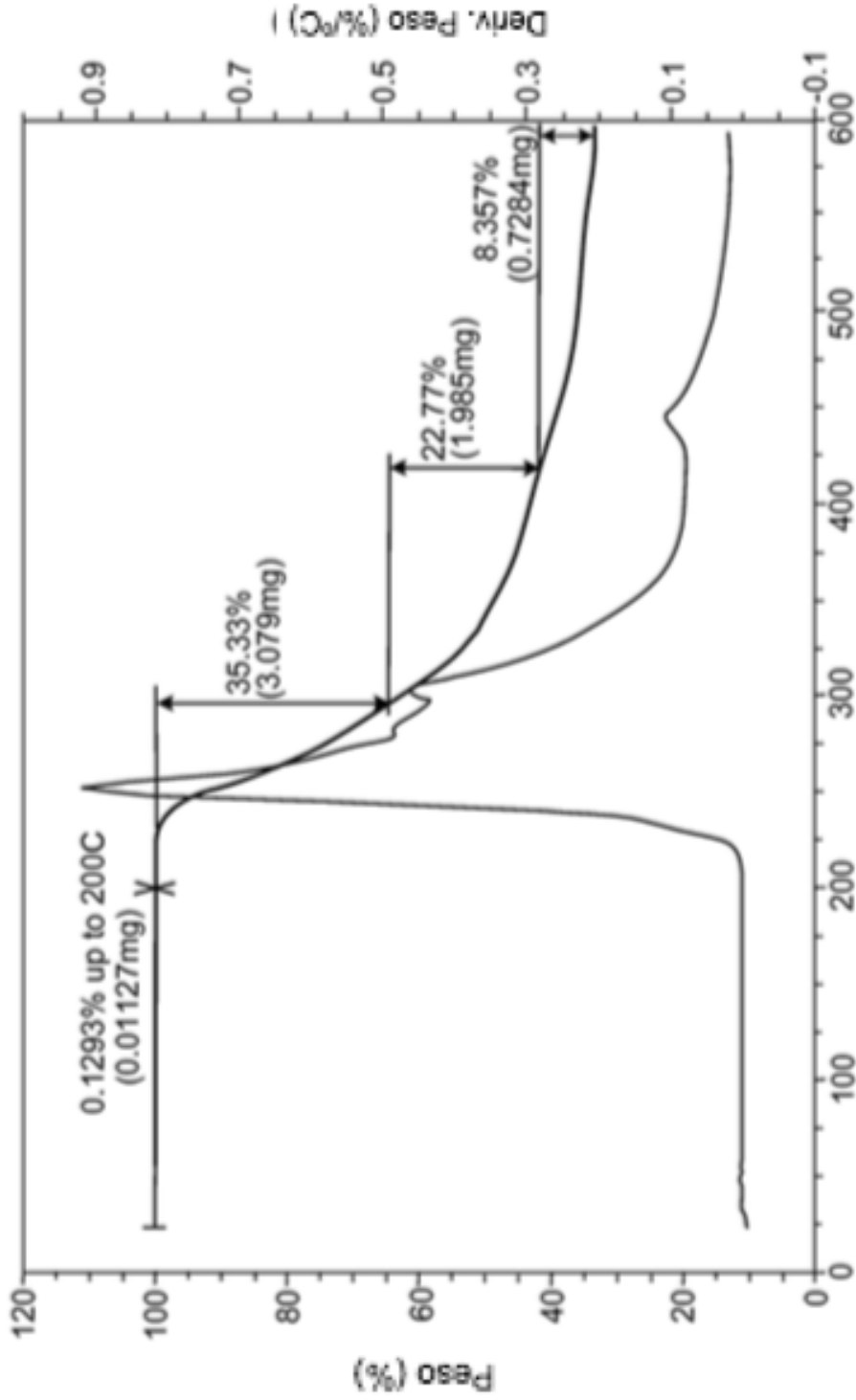


FIG. 4A



Universal V4.5A TA Instrumentos

FIG. 4B

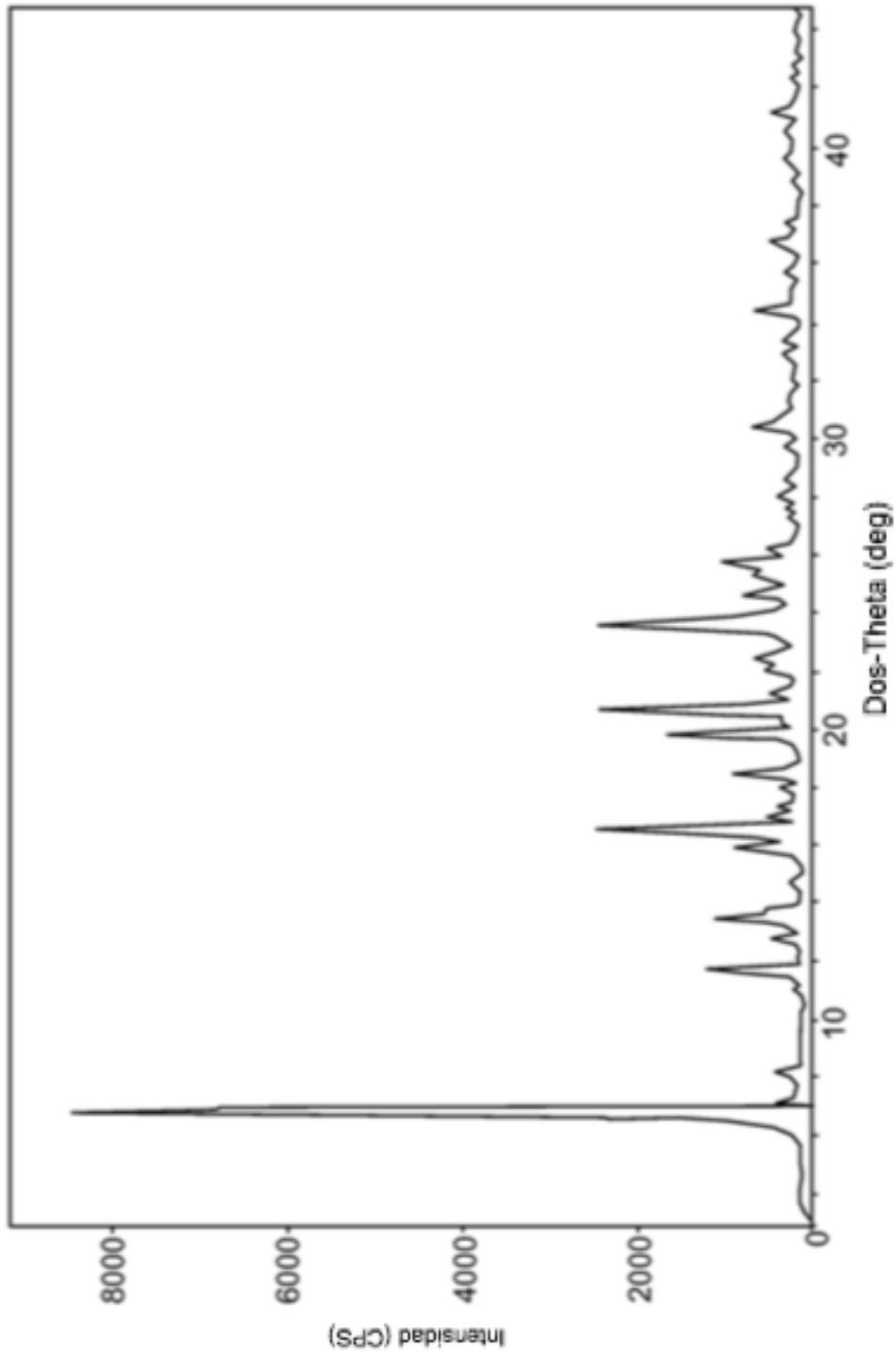
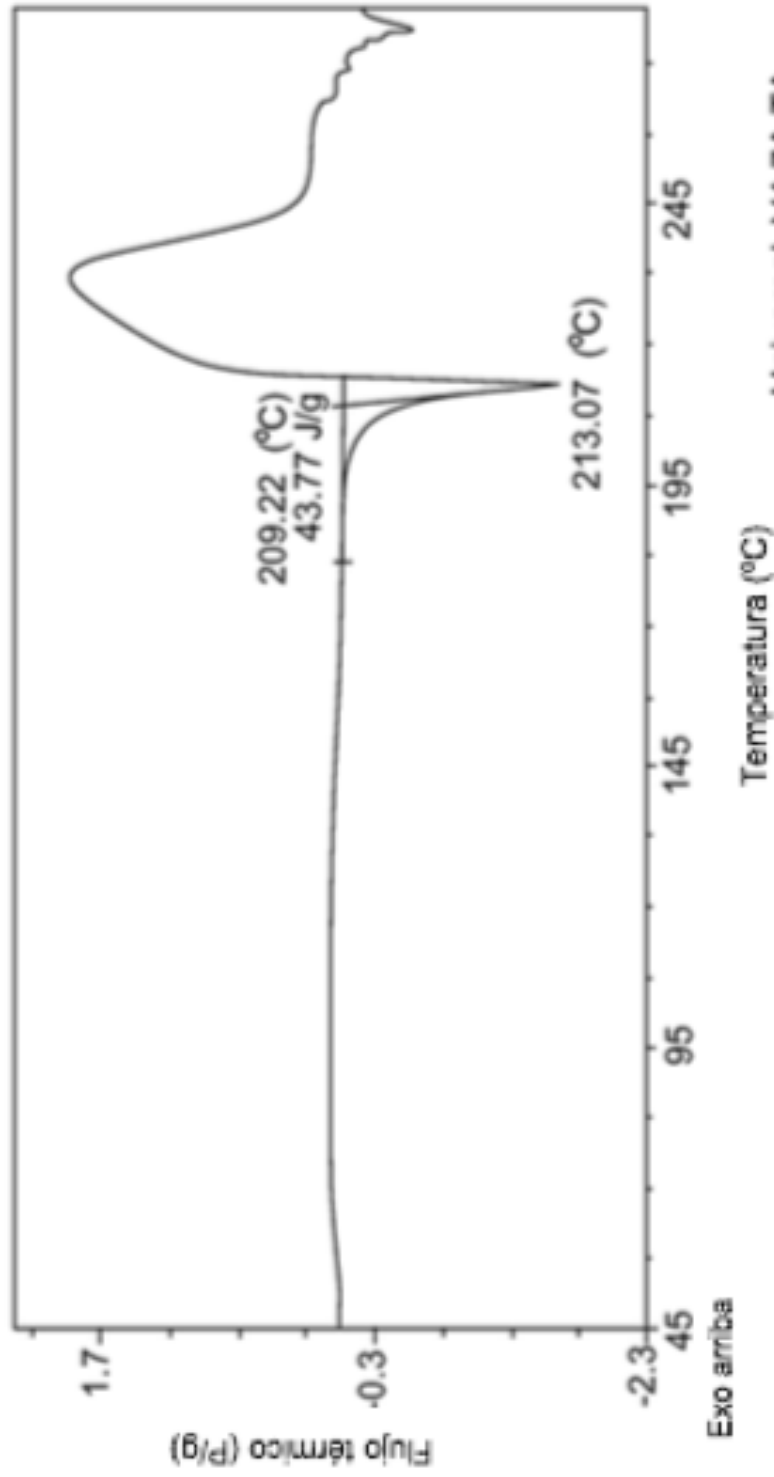
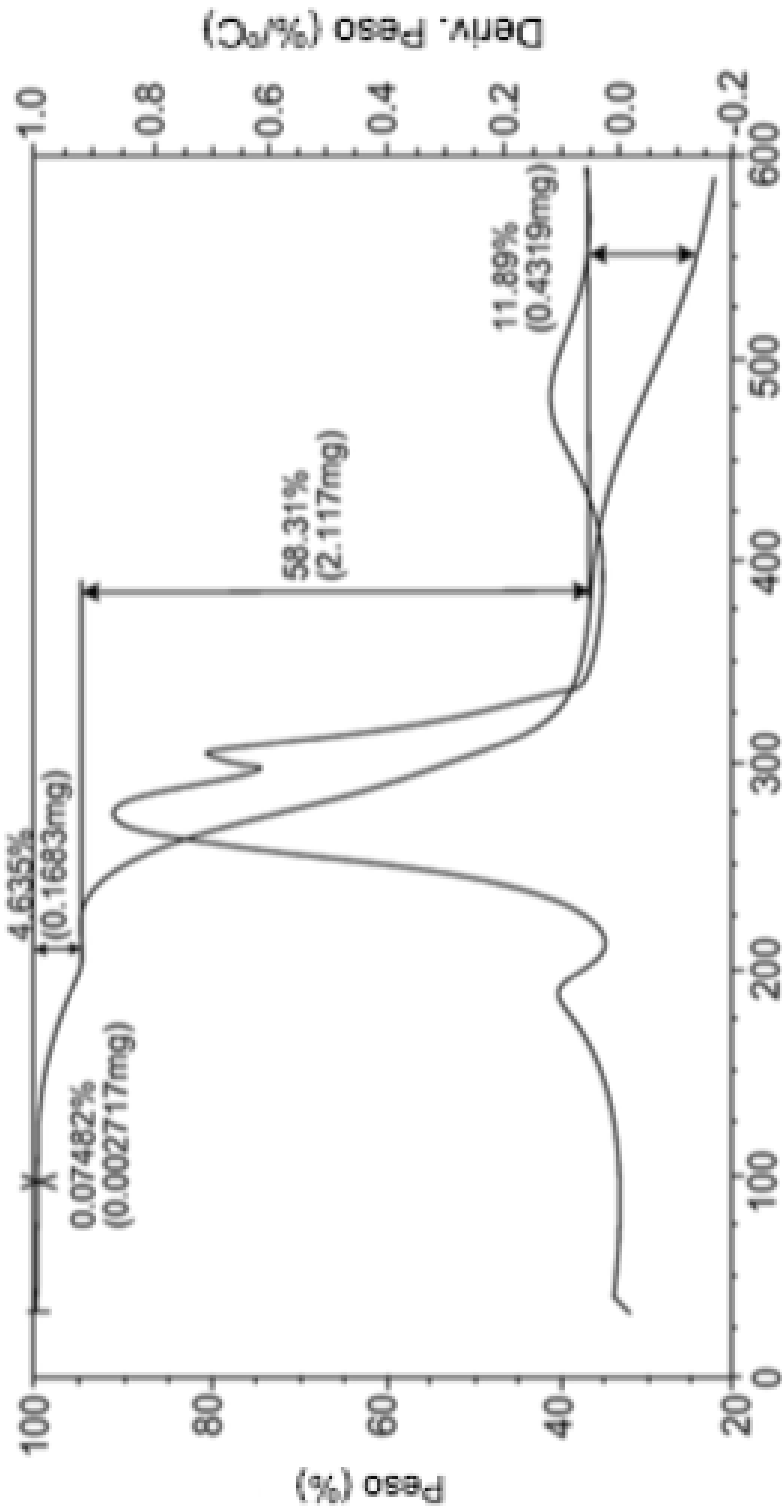


FIG. 4C



Universal V4.7A TA Instrumentos

FIG. 5A



Temperatura (°C)

Universal V4.5A TA Instrumentos

FIG. 5B

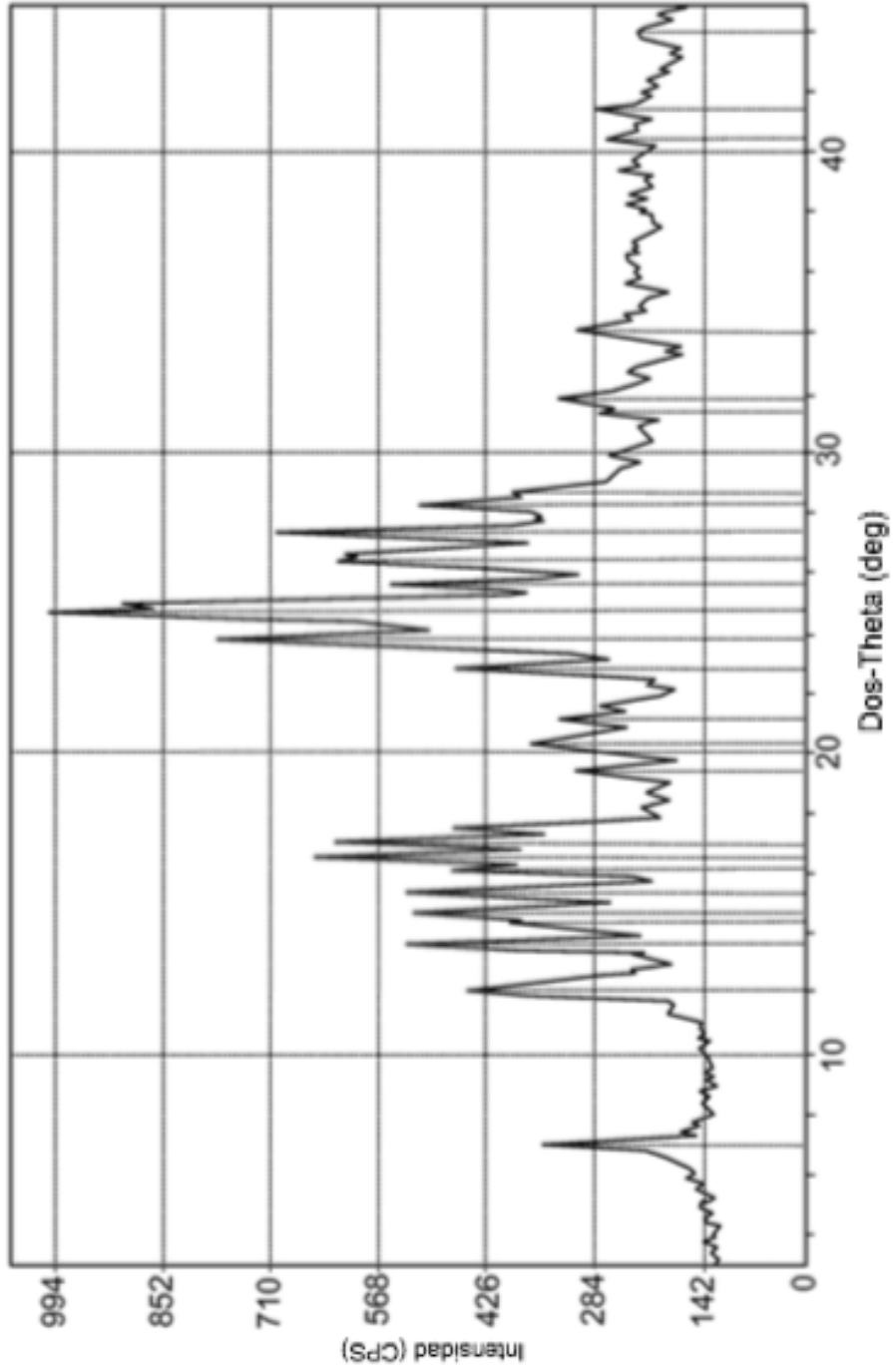


FIG. 5C

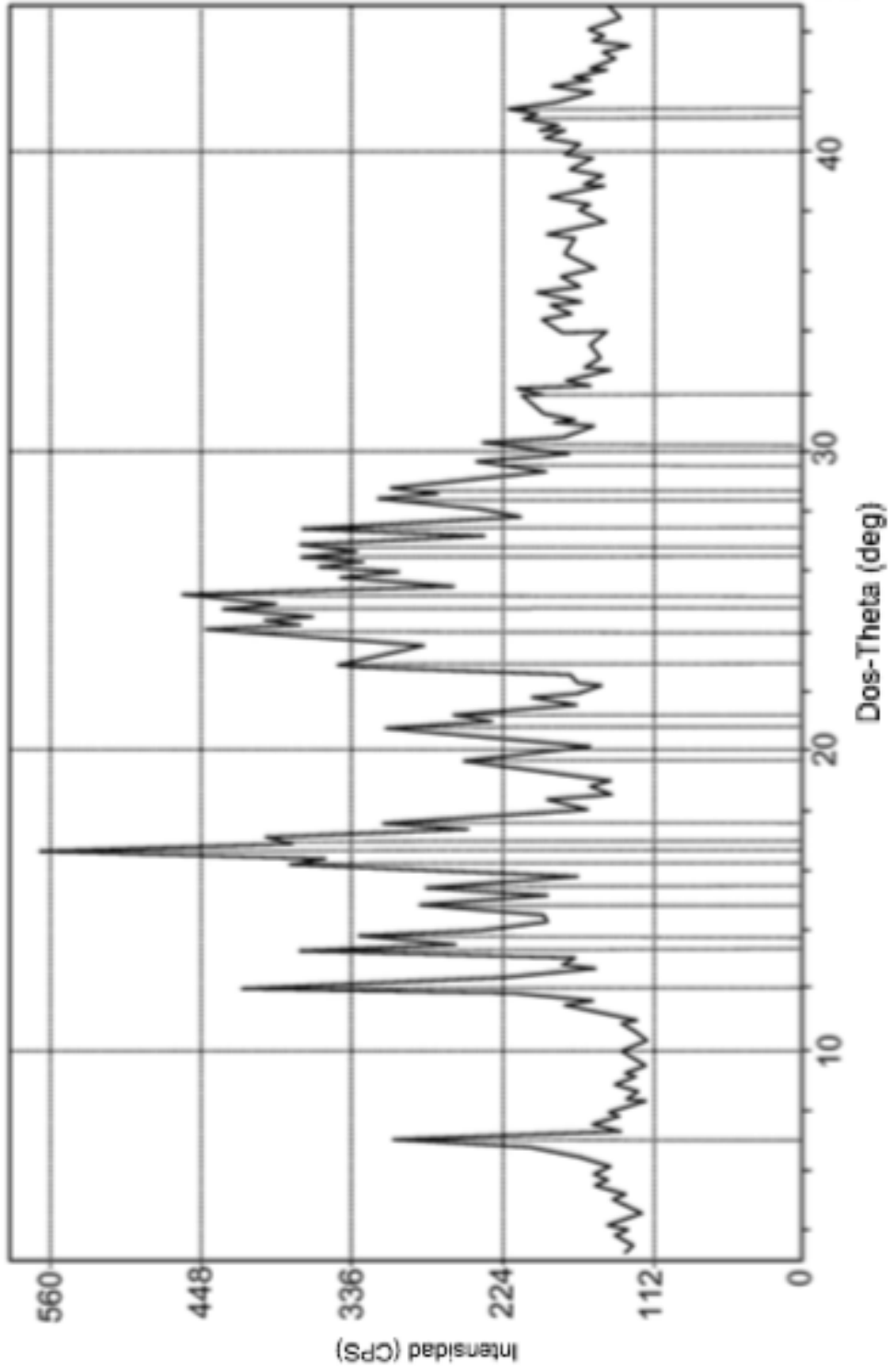


FIG. 6

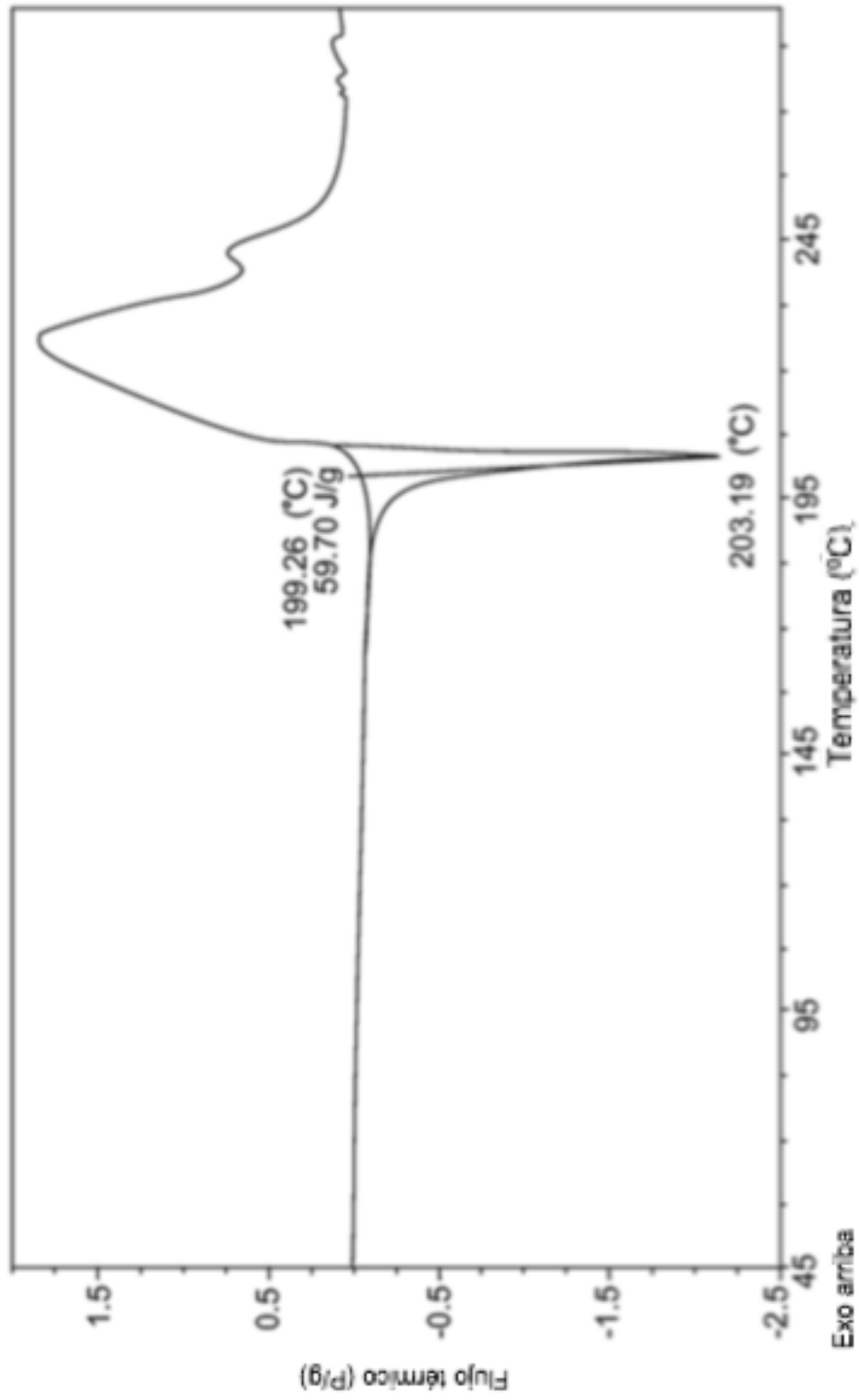
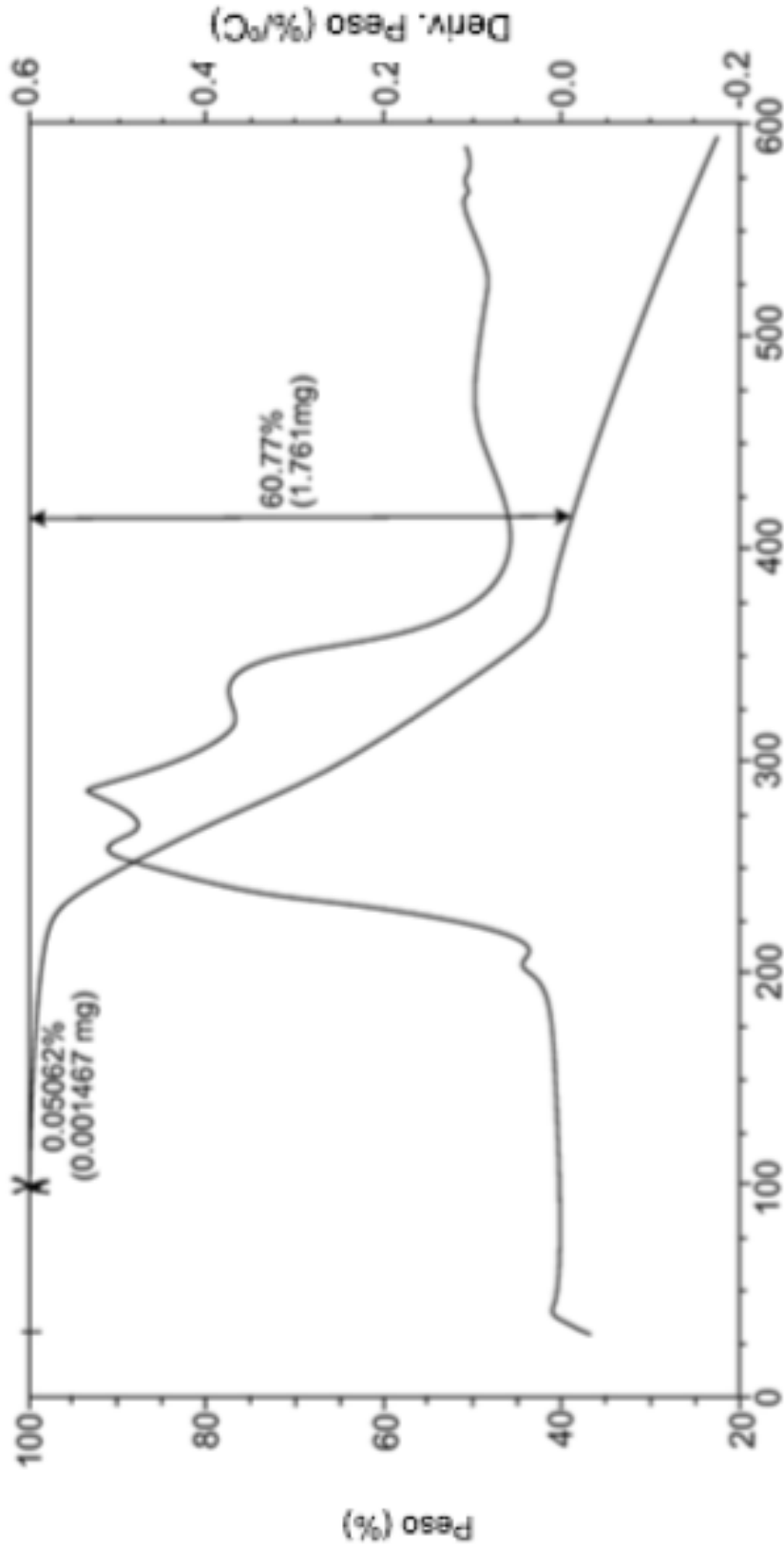


FIG. 7A

Universal V4.7A TA Instrumentos



Temperatura (°C)

FIG. 7B

Universal V4.5A TA | Instrumentos

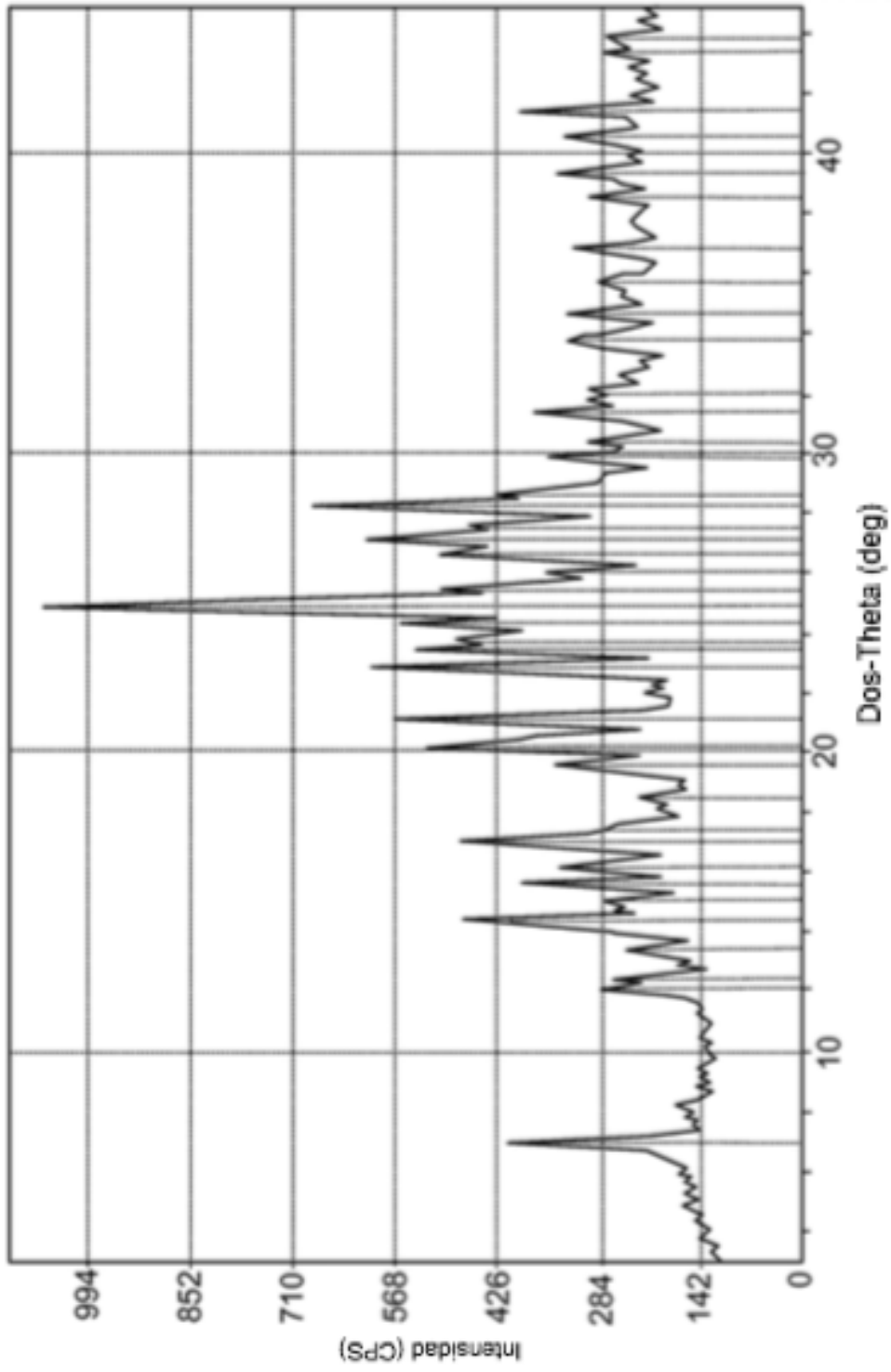
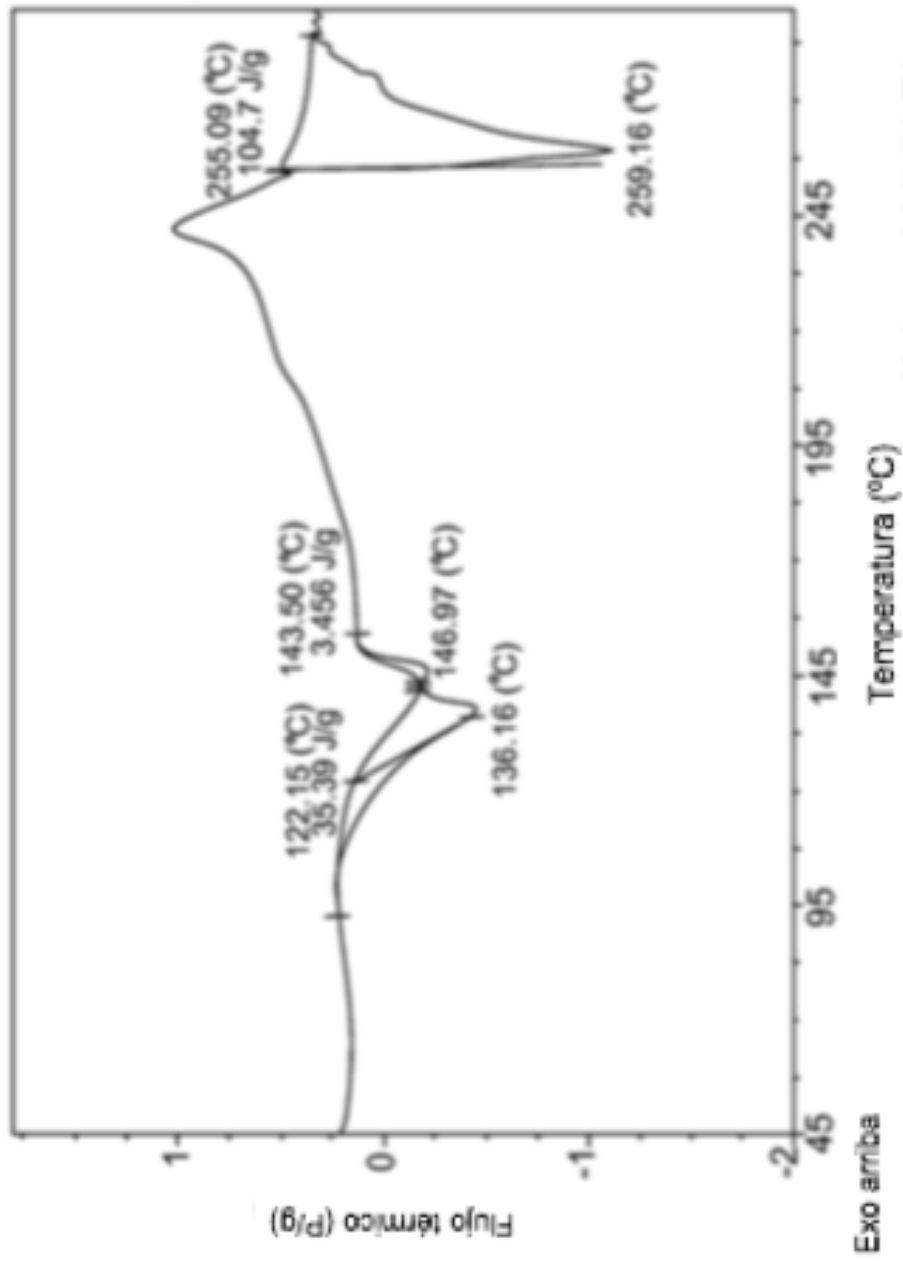


FIG. 7C



Universal V4.7A TA Instrumentos

FIG. 8A

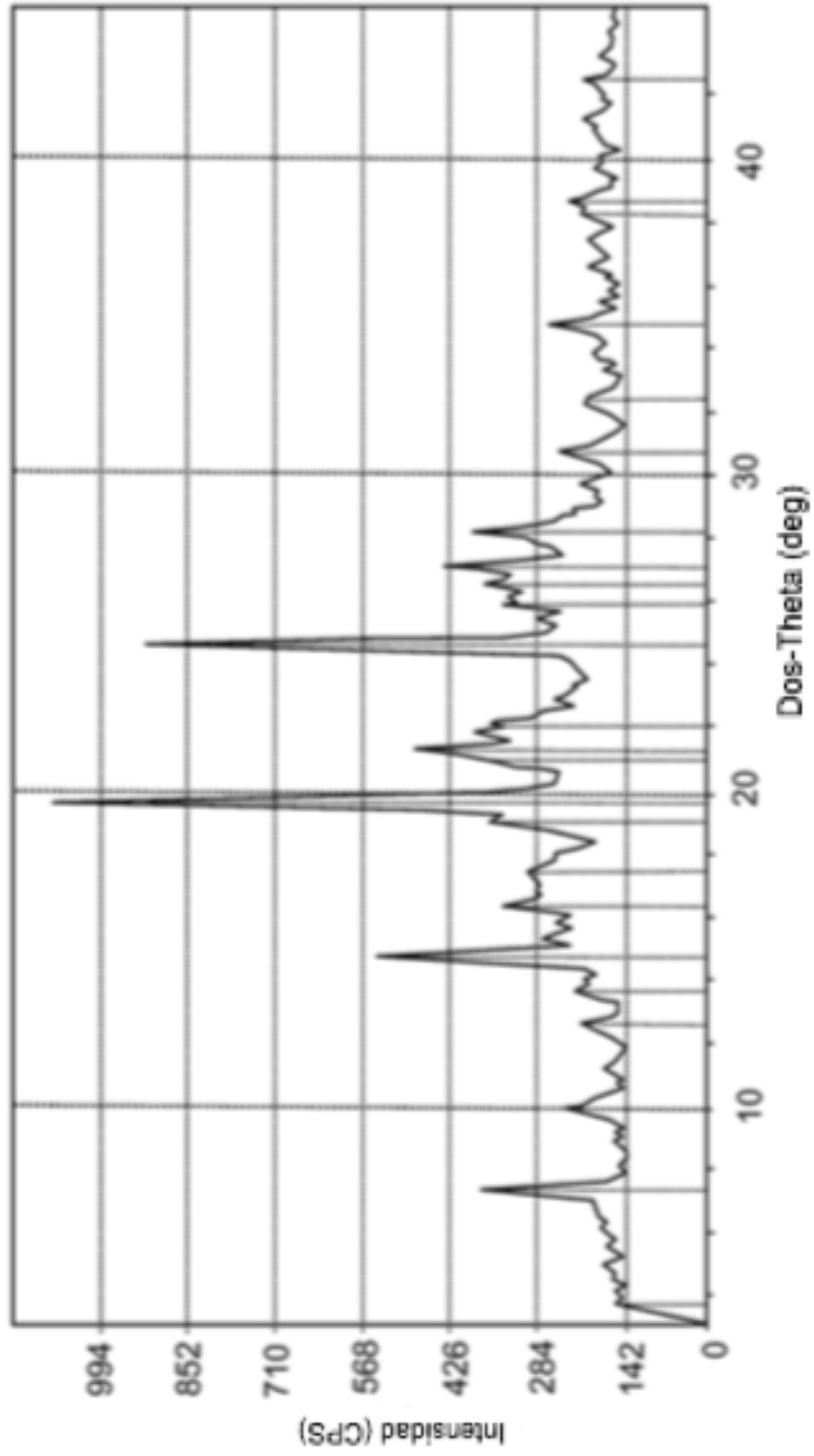


FIG. 8B

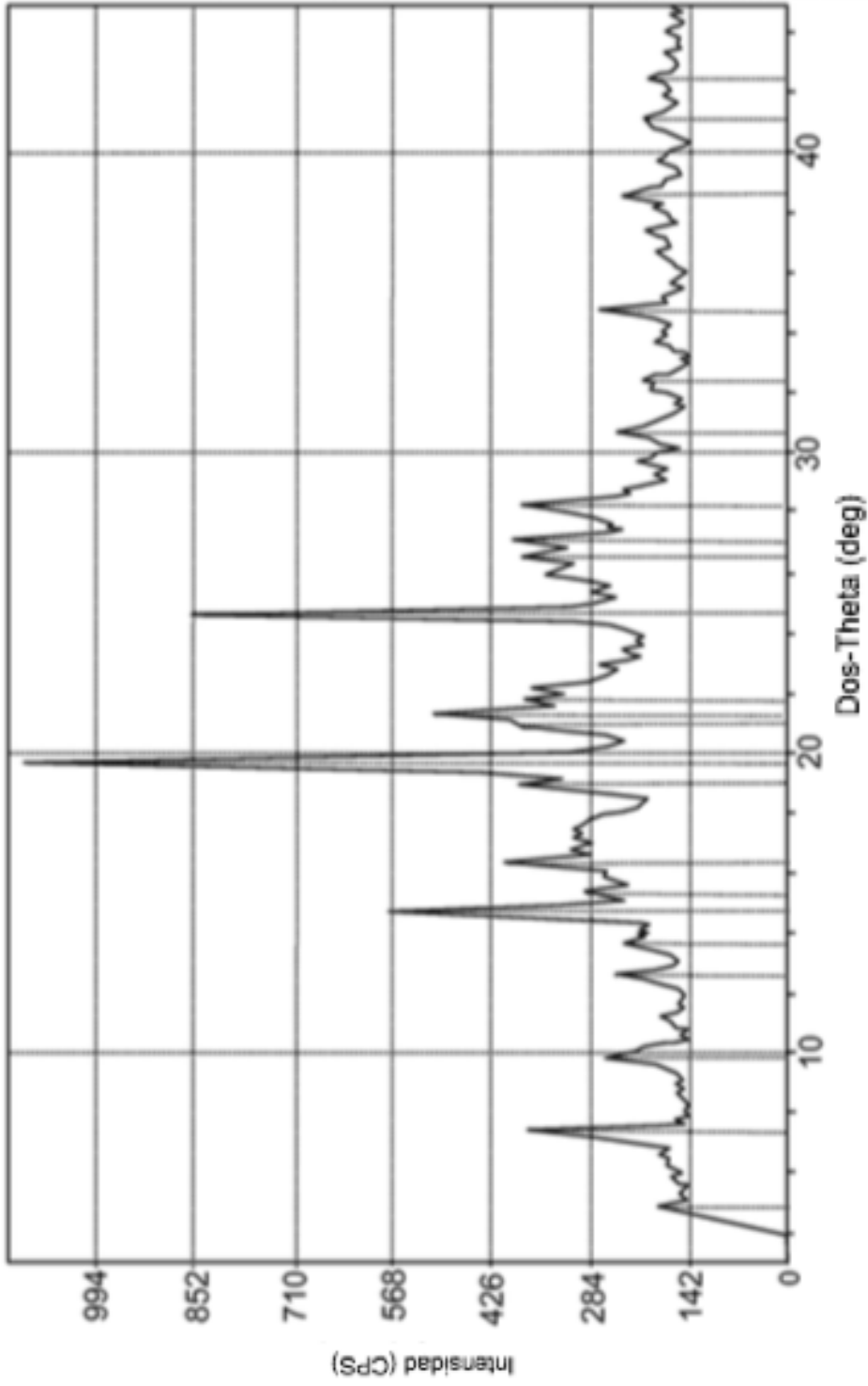


FIG. 9