

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 198**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2017 PCT/US2017/041388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18013486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2017 E 17740885 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3484875**

54 Título: **Inhibidores de JAK1**

30 Prioridad:

14.07.2016 US 201662362208 P

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

16.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BASTIAN, JOLIE ANNE;
CLAYTON, JOSHUA RYAN;
COATES, DAVID ANDREW;
SALL, DANIEL JON y
WOODS, TIMOTHY ANDREW**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 877 198 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de JAK1

5 La presente invención se refiere a compuestos de benzimidazol y a sus sales farmacéuticamente aceptables, que inhiben la Janus cinasa 1 (JAK1), a las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos y a los compuestos para su uso en el tratamiento de ciertos tipos de enfermedades autoinmunes.

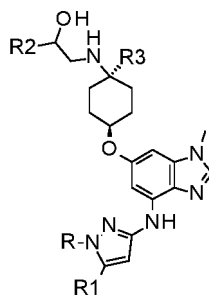
10 La familia de las Janus cinasas (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) son proteínas tirosina cinasas intracelulares con funciones esenciales en la función inmunológica, en la inflamación y en la hematopoyesis a través del transductor de señal de la Janus cinasa y la vía del activador de la transcripción (JAK-STAT). En respuesta a polipéptidos extracelulares tales como las citocinas tipo I y tipo II, las Janus cinasas regulan la fosforilación de tirosina de varios efectores e inician la activación de vías de señalización aguas abajo que inducen diferentes respuestas fisiológicas. Específicamente, la isoforma JAK1 juega un papel clave en la señalización del interferón de tipos I y II y provoca señales de la interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), glucoproteína 130 (gp130) y familias del receptor de clase II. Como tal, la inhibición de moléculas pequeñas de JAK1 puede intervenir en las vías de señalización implicadas en oncología, la inflamación y la enfermedad autoinmunitaria. Ghoreschi K *et al.* Immunological Review 2009, 228, 273-287 y Zak M. *et al.* Med Chem. 2013, 56, 4764-4785.

20 A pesar de los recientes éxitos de los agentes inhibidores de JAK, todavía existe la necesidad de descubrir y desarrollar inhibidores, que se dirigen selectivamente a una única isoforma de JAK. Esto puede mitigar el riesgo de efectos no deseados.

25 Los compuestos inhibidores de la Janus cinasa son conocidos en la bibliografía. Por ejemplo, el documento US 2015/0203455 desvela ciertos compuestos de benzimidazol que son inhibidores de JAK y que se promocionan como útiles para tratar enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias y enfermedades proliferativas, entre otras.

30 Sigue existiendo la necesidad de proporcionar inhibidores de JAK1 alternativos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular para las enfermedades inmunitarias, tales como artritis, artritis reumatoide y nefropatía diabética. Además, sigue siendo necesario proporcionar inhibidores selectivos de JAK1. La presente invención proporciona ciertos inhibidores de JAK1, que pueden abordar una o más de estas necesidades.

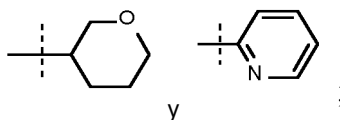
La presente invención proporciona un compuesto de fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:




1

35

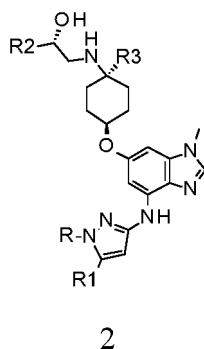
donde R se selecciona entre: H, -alquilo C₁₋₃, -CH₂CH(OH)CH₃, -alquil C₂₋₃-O-CH₃,



40

R1 se selecciona entre: H, -CH₃ y -OCH₃; R2 es -CHF₂ o -CF₃ y R3 es H o -CH₃; con la condición de que cuando R2 es -CF₃ y R3 es H, o R o R1 puede ser -CH₃ pero no ambos. El enlace ilustrado como  indica el punto de unión del anillo de tetrahidropirano o anillo de piridina al resto de la molécula.

45 La presente invención proporciona un compuesto de fórmula 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es,

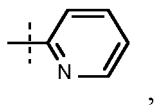


donde R se selecciona entre: H, -alquilo C₁₋₃, -CH₂CH(OH)CH₃, -alquil C₂₋₃-O-CH₃,

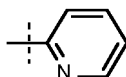


R1 se selecciona entre: H, -CH₃ y -OCH₃; R2 es -CHF₂ o -CF₃ y R3 es H o -CH₃; con la condición de que cuando R2 es -CF₃ y R3 es H, o R o R1 puede ser -CH₃ pero no ambos.

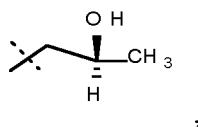
- 10 En una forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 donde R se selecciona entre: -CH₃, -CH₂CH₃ y



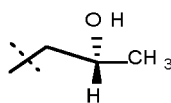
- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones, R es -CH₃, o -CH₂CH₃. En otras realizaciones, R es



- 20 En otra forma la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 donde R es



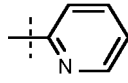
- 25 donde el enlace ilustrado como indica el punto de unión al resto de la molécula. En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 donde R es



- 30 En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 donde R1 se selecciona entre: H, -CH₃ y -OCH₃. En ciertas realizaciones R1 es H o -CH₃. En otras realizaciones, R1 es -OCH₃.

En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 donde R2 es -CF₃ En ciertas realizaciones de esta forma, R es -CH₃, o -CH₂CH₃ y R1 es -CH₃ o -OCH₃. En otras realizaciones de esta forma,

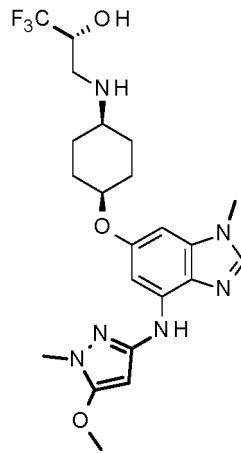
R es



5 y R1 es H.

En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 o 2 en donde R3 es -CH₃.

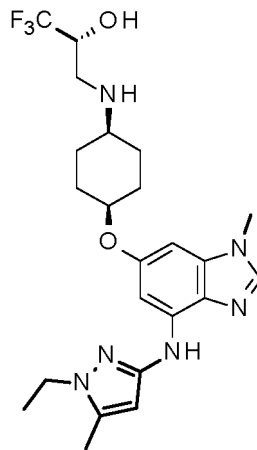
10 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 3 que es



3,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 4 que es



4,

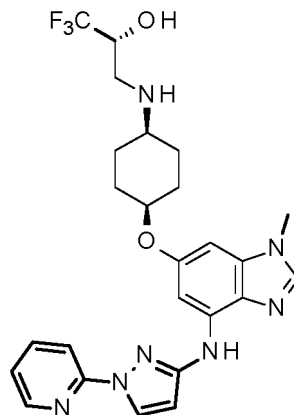
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En otra realización más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 5, que es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 6 que es

5



6,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización la composición farmacéutica comprende un compuesto de fórmula 6 en forma de un compuesto neutro como una base libre o un zwitterión. En una realización, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula 6 en forma de una sal citrato. En otra realización más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 6 como una base libre en forma cristalina caracterizado por un patrón de difracción de rayos C en polvo obtenido a partir de una fuente de CuK α ($\lambda=1,54060$ Å), que tiene un máximo a 20,5 junto con uno o más máximos seleccionados entre el grupo que consiste en 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 22,9 y 23,6; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

10

15

En otra realización más, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula 6 como 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(2-(1H-piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1) en forma cristalina caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido de una fuente de CuK α ($\lambda=1,54060$ Å), que tiene un máximo de 17,9 junto con uno o más máximos seleccionados entre el grupo que consiste en 26,1, 26,6 y 22,7; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

20

25

En otra forma, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos uno de un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

35

En otra forma, la presente invención proporciona una composición que comprende 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(2-(1-piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1) en forma cristalina. Preferentemente, la composición comprende más del 80 % (peso/peso) de 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(2-(1-piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1) en forma cristalina. Más preferentemente más del 90 % (peso/peso) de 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(2-(1-piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1) en forma cristalina. Aún más preferentemente más del 95 % (peso/peso) de 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(2-(1-piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1) en forma cristalina.

40

En otra forma, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos uno de un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45

En una realización la composición farmacéutica comprende un compuesto de las fórmulas 1 a 6 en forma de un compuesto neutro o un zwitterión. En otra realización la composición farmacéutica comprende un compuesto de las fórmulas 1 a 6 en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la composición farmacéutica comprende un compuesto de las fórmulas 1 a 6 en forma de una sal citrato.

En otra forma, la presente invención proporciona un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas 1 a 6 para su uso en terapia.

5 En una realización, la terapia para la cual se puede usar el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas 1 a 6, se selecciona entre: artritis, más preferentemente artritis reumatoide; nefropatía diabética; lupus, más preferentemente lupus sistémico eritematoso; síndrome de Sjögren y enfermedad inflamatoria del intestino, más preferentemente enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

En otra forma, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas 1 a 6 en la producción de un medicamento.

10 En una realización, el medicamento es útil para tratar la artritis. En otra realización, el medicamento es útil para tratar la artritis reumatoide. En otra realización más, la medicación es útil para tratar una afección seleccionada entre; nefropatía diabética; lupus, más preferentemente lupus sistémico eritematoso; síndrome de Sjögren y enfermedad inflamatoria del intestino, más preferentemente, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. En otra realización más, el medicamento es útil para tratar la nefropatía diabética. En otra realización más, el medicamento es útil para tratar el lupus. En otra realización más, el medicamento es útil para tratar el síndrome de Sjögren. En otra realización más, el medicamento es útil para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino.

20 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a una sal de un compuesto de la invención que se considera que es aceptable para su uso clínico y/o veterinario. Se pueden encontrar ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables y metodologías comunes para su preparación en P. Stahl, *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2ª edición revisada, Wiley-VCH, 2011 y S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 66, n.º 1, enero de 1977.

25 Las composiciones farmacéuticas para la presente invención se pueden preparar por procedimientos conocidos en la técnica usando aditivos farmacéuticamente aceptables. La expresión "aditivo o aditivos farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento para las composiciones farmacéuticas, se refiere a uno o más vehículos, diluyentes y excipientes que son compatibles con los otros aditivos de la formulación y no son perjudiciales para el paciente. Se conocen las composiciones farmacéuticas y los procesos para su preparación y se pueden encontrar ejemplos en Loyd, V., *et al.* eds. Remington: The Science and Practice of Pharmacy 22ª ed., Mack Publishing Co., 30 2012. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen los siguientes: solución salina, agua, almidón, azúcares, manitol y derivados silícicos; agentes aglutinantes tales como carboximetil celulosa y otros derivados celulósicos, alginatos, gelatina y polivinil-pirrolidona; caolín y bentonita; polietilglicoles.

35 Las composiciones farmacéuticas preferidas se pueden formular en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones para administración oral o soluciones para inyección. El comprimido, cápsula o solución puede incluir un compuesto de la presente divulgación en una cantidad eficaz para tratar a un paciente que necesita tratamiento.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es una dosis, que es eficaz para tratar un trastorno, tal como artritis, una enfermedad autoinmune o cáncer. El médico responsable o el veterinario, como un experto en la técnica, puede determinar con facilidad una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas convencionales y la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Se pueden considerar diversos factores para determinar la cantidad eficaz o dosis; los factores incluyen, pero no se limitan a, se administrará el compuesto o su sal; la coadministración de otros agentes, si se usan; la especie del paciente; su tamaño, edad y salud general; el grado de afectación o la gravedad del trastorno; la respuesta del paciente individual; 45 el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la posología seleccionada; el uso de otra medicación simultánea y otras circunstancias relevantes.

50 Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero, aves o peces. Los mamíferos preferidos incluyen un ser humano, un mamífero de compañía, tal como un perro o un gato o un animal doméstico o ganado, tal como una vaca, cerdo, caballo, oveja y cabra.

La expresión "sustancialmente puro" se refiere a una composición que es más del 80 % puro, más preferentemente más del 90 % puro y aún más preferentemente más del 95 % puro en una base de peso por peso.

55 Los compuestos de la presente invención se pueden usar solos o combinados con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo los compuestos de la presente invención se pueden combinar con agentes para el tratamiento para el tratamiento de inflamación y/o enfermedades autoinmunes. Los ejemplos incluyen inhibidores NSAID o COX-2, tales como ibuprofeno, aspirina, acetaminofeno, celecoxib, naproxeno y ketoprofeno; opioides, tales oxicodona y fentanilo; metotrexato y corticosteroides, tales como hidrocortisona, prednisolona y prednisona.

60 Los compuestos también se pueden combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales eficaces para tratar cánceres. Los ejemplos incluyen cisplatino, carboplatino, etopósido, gemcitabina, paclitaxel, vinorelbina, toptotecán, irinotecán, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y metotrexato.

65 Los compuestos a modo de ejemplo y el o los agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar bien juntos mediante la misma vía y dispositivo de suministro tal como una única píldora, cápsula o comprimidos o bien

administrarse por separado ya sea al mismo tiempo en dispositivos de suministro separados o de forma secuencial.

Sección química

- 5 Los compuestos de la presente invención o las sales de los mismos, se pueden preparar por diversos procedimientos, algunos de los cuales están ilustrados en las preparaciones y ejemplos siguientes. El o los productos de cada etapa en los procedimientos siguientes se pueden recuperar por métodos convencionales, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, triturado y cristalización. Los reactivos y materiales de partida están disponibles con facilidad para el experto en la técnica. En las preparaciones descritas más adelante, el
- 10 sustituyente de amina puede estar protegido para facilitar la síntesis de los compuestos descritos en el presente documento.

- Como se usa en el presente documento, los términos siguientes tienen los significados indicados: "AcOH" se refiere a ácido acético glacial, "CE₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce una respuesta del 50 % de la actividad diana en comparación con un compuesto de control positivo predefinido (CE₅₀ absoluta); "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "ES/MS" se refiere a electropulverización/espectroscopía de masas; "DCM" se refiere a diclorometano; DMF" se refiere a *N,N*-dimetilformamida; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "GC-MS" se refiere a gas cromatografía de gases-espectrometría de masas; "GFP" se refiere a proteína fluorescente de color verde; "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico; "h" se refiere a hora u horas; "Cl₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente (Cl₅₀ relativa) o la concentración de un agente que produce el 50 % de inhibición de la actividad diana en comparación con un control placebo (Cl₅₀ absoluta) "LC-MS" se refiere a cromatografía líquida-espectrometría de masas; "MeOH" se refiere a metanol; "min" se refiere a minutos; "MS" se refiere a espectroscopía de masas; "MTBE" se refiere a éter *tert*-butil metílico, "OAc" se refiere a acetato o anión acetato; "QD" se refiere a una vez al día; "TA o ta" se refiere a temperatura ambiente; "STAT1" se refiere a transductor de señal y activador de la transcripción 1; "THF" se refiere a tetrahidrofurano y "TR-FRET" se refiere a transferencia de energía de fluorescencia resuelta en el tiempo.
- 15
- 20
- 25

- En la técnica se conocen diversas funcionalidades de protección de amina e incluyen: carbamatos tales como carbamato de alquilo C₁₋₅, carbamato de cicloalquilo C₃₋₆, preferentemente un carbamato de *t*-butilo, (BOC) o carbamato de bencilo (CBZ); amidas tales como alquilamida C₁₋₃, haloalquilamida C₁₋₃, formamida o acetamida, cloroacetamida, trifluoroacetamida y bencil aminas. Se pueden encontrar más ejemplos de funcionales de protección de amina, métodos para preparar los sustituyentes de amina protegidos y métodos para desproteger los sustituyentes de amina en "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", 5ª ed., Wuts, P.G.M., Eds. John Wiley y Sons, 2014. Los expertos en la técnica reconocerán que otros grupos funcionales, que se pueden convertir con facilidad al grupo amina, se pueden usar. Dichos grupos funcionales, preparaciones y transformaciones de estos grupos se pueden encontrar en "Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations" by Larock. R.C., Wiley VCH, 1999 y en "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure" Smith, M.B., Wiley-Interscience, 7ª ed., 2013.
- 30
- 35

40 Preparación 1

(2R)-2-(trifluorometil)oxirano

- Añadir ácido acético (0,89 ml, 0,052 equiv.) a una solución de (1S,2S)-(+)-1,2-ciclohexanodiamino-*N,N*'-bis(3,5-di-*t*-butilsaliciliden)cobalto (II) (0,90 g, 0,0050 equiv.) en tolueno (16,65 ml). Agitar a ta durante 30 min. Eliminar el disolvente al vacío. Añadir tolueno (20 ml) y concentrar al vacío. Enfriar a 0 °C y añadir 2-(trifluorometil)oxirano (37,00 g, 330 mmol; 80,0 % de ee, (2R) es el enantiómero principal). Agitar durante cinco minutos y añadir agua (0,80 ml, 0,15 equiv.) gota a gota. Calentar lentamente a ta y agitar durante una noche. Destilar al vacío a ta y recoger el compuesto del título en un matraz enfriado en forma de un aceite de color amarillo claro (28,10 g, 76 %; 99,8 % de ee). RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,92-2,94 (m, 1H), 2,98-3,01 (m, 1H), 3,41-3,46 (m, 1H).
- 45
- 50

- Combinar el compuesto del título (0,13 g, 1,16 mmol) y MeOH (1,3 ml). Enfriar a 0 °C y añadir trietilamina (0,17 ml, 1,10 equiv.) y tiofenol (0,12 ml, 1,05 equiv.). Agitar la mezcla durante 30 min. Controlar la reacción mediante GC-MS para la formación de 1,1,1-trifluoro-3-fenilsulfanil-propan-2-ol; *m/z* = 222. El análisis del producto por LC-MS quiral revela que la pureza isomérica del producto es del 99,8 % de ee, (2S)-1,1,1-trifluoro-3-fenilsulfanil-propan-2-ol es el enantiómero principal.
- 55

Preparación 2

60 1-bromo-3,5-difluoro-2-nitrobenzoceno

- Añadir ácido nítrico (fumante, 20 ml) gota a gota a una solución de 1-bromo-3,5-difluorobenceno (35,00 ml, 304 mmol) en ácido sulfúrico (50 ml) a 0 °C. Calentar lentamente a ta y agitar durante una noche. Verter la mezcla de reacción en una mezcla de hielo y agua (600 ml). Calentar lentamente a ta. Añadir EtOAc (200 ml) y hexanos (100 ml). Agitar hasta disolver todos los sólidos. Separar las capas. Lavar la capa orgánica con cloruro sódico acuoso saturado, secar sobre Na₂SO₄, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color
- 65

amarillo (57,37 g, 79 %). GC-MS $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 237, 239 (M+H).

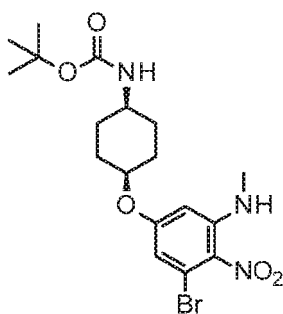
Preparación 3

5 3-bromo-5-fluoro-N-metil-2-nitroanilina

Añadir monometilamina 2 M en tetrahidrofurano (92 ml, 2,00 equiv.) a una solución de 1-bromo-3,5-difluoro-2-nitrobenzoceno (21,90 g, 92 mmol) en 1,4-dioxano (92 ml). Agitar a ta durante 45 min. Añadir agua; después extraer con EtOAc. Recoger los extractos orgánicos y lavar con cloruro sódico acuoso saturado. Secar sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 20-40 % de DCM en hexanos, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja (16,95 g, 74 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 249/251 (M+H).

Preparación 4

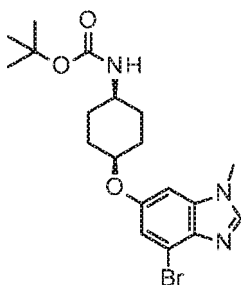
15 {*Cis*-4-[3-bromo-5-(metilamino)-4-nitrofenoxi]ciclohexil}carbamato de *tert*-butilo



20 Combinar 3-bromo-5-fluoro-N-metil-2-nitroanilina (75,04 g, 301 mmol), (*cis*-4-hidroxiciclohexil)carbamato de *tert*-butilo (89,52 g, 1,38 equiv.), tetra(*n*-butil)amonio bisulfato (15,58 g, 0,15 equiv.) en DCM (975 ml) e hidróxido sódico acuoso 5 M (241 ml). Agitar rápidamente a 37 °C en atmósfera de nitrógeno durante cinco días. Enfriar a ta. Diluir con DCM (200 ml) y agua (400 ml). Separar las capas. Extraer la acuosa con DCM (3 x 100 ml). Lavar los extractos orgánicos combinados con cloruro sódico acuoso combinado, secar sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-40 % de EtOAc en hexanos, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color naranja (68,57 g, 51 %). MS (ES) $m/z = \text{C}^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ 442/444 (M-H).

Preparación 5

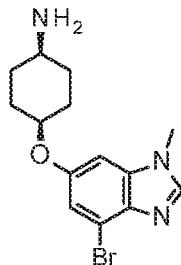
30 {*cis*-4-1(4-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}carbamato de *tert*-butilo



35 Combinar {*cis*-4-[3-bromo-5-(metilamino)-4-nitrofenoxi]ciclohexil}carbamato de *tert*-butilo (76,92 g, 173 mmol) y platino (5 % sobre sulfuro de carbono, 3,85 g) en tetrahidrofurano (923 ml) en un reactor Parr®. Agitar a ta en atmósfera de H_2 (414 kPa) durante tres días. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar la tierra de diatomeas con THF. Añadir trimetilortoformiato (165 ml, 8,70 equiv.) a los filtrados con THF combinados. Agitar durante 22 horas a 63 °C. Concentrar la mayoría de la mezcla de reacción al vacío. Diluir con agua (400 ml) y EtOAc (400 ml). Basificar con carbonato sódico acuoso para ajustar el pH a 9. Separar las capas. Extraer las acuosas con EtOAc (2 x 200 ml). Secar los extractos orgánicos combinados sobre Na_2SO_4 anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío. Diluir el residuo con éter *tert*-butil metílico (400 ml) y someter a sonicación durante 30 minutos. Filtrar, lavar con éter *tert*-butil metílico y secar al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo claro (52,02 g, 71 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 424/426 (M+H).

Preparación 6

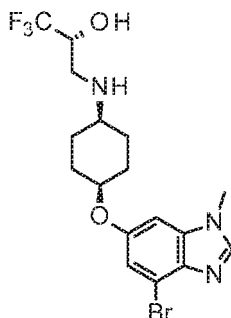
5 *Cis*-4-[-(metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina



10 Añadir ácido trifluoroacético (666 ml) lentamente a una solución de {*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}carbamato de *terc*-butilo (222 g, 497 mmol) en DCM (1110 ml) a 0 °C. Calentar lentamente la mezcla a ta y agitar durante una noche. Concentrar la mezcla al vacío. Añadir agua (250 ml) y basificar con hidróxido sódico acuoso al 50 % para ajustar el pH a 10. Añadir agua (250 ml). Extraer con MeOH al 20 % en DCM (1500 ml, después 500 ml, después 250 ml). Lavar los extractos orgánicos combinados con hidróxido sódico acuoso 2 M, secar sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (155 g, 91 %). MS (ES) *m/z* = (⁷⁹Br/⁸¹Br) 324/326 (M+H).

Preparación 7

(2R)-3-({*cis*-4-[(4-Bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



20 Añadir (2R)-2-(trifluorometil)oxirano (73,29 g, 1,50 equiv.) a una solución de *cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina (150,4 g, 436 mmol) en MeOH (1053 ml). Agitar a ta durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-10 % de EtOH en DCM, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (98,10 g, 52 %). MS (ES) *m/z* = (⁷⁹Br/⁸¹Br) 436/438 (M+H).

Preparación 8

30 1-(3-metoxipropil)-5-metil-3-nitro-1H-pirazol

35 Añadir acetonitrilo (56 ml) a una mezcla de 5-metil-3-nitro-1H-pirazol (3,0 g, 22 mmol), carbonato potásico (6,2 g, 2,0 equiv.) y 1-bromo-3-metoxipropano (3,8 g, 1,1 equiv.). Agitar a 65 °C durante una noche. Enfriar a ta. Añadir EtOAc (~50 ml) y filtrar. Concentrar el filtrado al vacío. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con EtOAc al 35 % en hexanos, para dar el compuesto del título (3,3 g, 70 %). MS (ES) *m/z* = 200 (M+H).

Preparación 9

40 1-(3-metoxipropil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina

45 Añadir paladio sobre carbón (5 % p/p, 0,38 g) a un reactor Parr ® de 500 ml. Purgar el reactor con N₂ y añadir EtOH (100 ml). Añadir una solución de 1-(3-metoxipropil)-5-metil-3-nitro-1H-pirazol (3,3 g, 17 mmol) en EtOH (100 ml). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (413,69 kPa (60 psi)) durante dos horas. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color naranja (2,7 g, 96 %). MS (ES) *m/z* = 170 (M+H).

Preparación 10

1-(2-metoxietil)-5-metil-3-nitro-1H-pirazol

5 Añadir acetonitrilo (35 ml) a una mezcla de 5-metil-3-nitro-1H-pirazol (0,95 g, 7,1 mmol), carbonato potásico (2,0 g, 2,0 equiv.) y 1-bromo-2-metoxietano (2,0 ml, 3,0 equiv.). Agitar a 75 °C durante tres horas. Enfriar a ta. Añadir éter dietílico (~35 ml) y filtrar. Aclarar los sólidos con EtOAc (2 x 25 ml). Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-100 % de EtOAc en hexanos, para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (1,1 g, 64 %). MS (ES) m/z = 186 (M+H).

Preparación 11

1-(2-metoxietil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina

15 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 0,38 g) a un matraz. Purgar con N₂ y añadir EtOH (10 ml). Añadir una solución de 1-(2-metoxietil)-5-metil-3-nitro-1H-pirazol (0,86 g, 4,6 mmol) en EtOH (40 ml). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante una noche. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color pardo (0,68 g, 84 %). MS (ES) m/z = 156 (M+H).

Preparación 12

1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol

25 Añadir acetonitrilo (75 ml) a una mezcla de 5-metil-3-nitro-1H-pirazol (2,0 g, 15 mmol), carbonato potásico (4,1 g, 2,0 equiv.) y 1-cloro-2-propanol (3,8 ml, 3,0 equiv.). Agitar a 85 °C durante una noche. Enfriar a ta. Filtrar y aclarar los sólidos con EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con EtOAc al 50 % en hexanos, para dar el compuesto del título (2,0 g, 65 %). MS (ES) m/z = 186 (M+H).

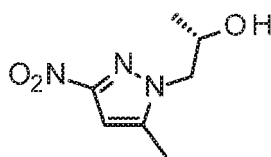
Preparación 13

1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol

35 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 0,35 g) a un matraz. Purgar con N₂ y añadir EtOH (50 ml). Añadir una solución de 1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (2,0 g, 11 mmol) en EtOH (150 ml). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante una noche. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color rosa (1,2 g, 69 %). MS (ES) m/z = 156 (M+H).

Preparación 14

(2S)-1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol

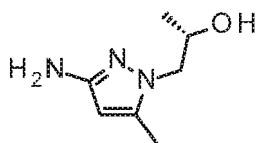


45 Añadir acetonitrilo (45 ml) a una mezcla de 5-metil-3-nitro-1H-pirazol (1,2 g, 9,0 mmol), carbonato potásico (2,5 g, 2,0 equiv.) y (S)-1-cloro-2-propanol (0,98 g, 1,2 equiv.). Agitar a 85 °C durante cuatro días. Enfriar a ta. Filtrar para recoger el sólido y aclarar el sólido con EtOAc, después desechar el sólido. Recoger y concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con EtOAc al 50 % en hexanos, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (1,1 g, 67 %). MS (ES) m/z = 186 (M+H).

Preparación 15

(2S)-1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol

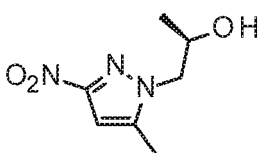
55



- 5 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 0,22 g) a un matraz. Añadir una solución de (2S)-1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (1,1 g, 6,0 mmol) en EtOH (50 ml). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante una noche. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar los sólidos con MeOH. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título (0,89 g, 9,5 %). MS (ES) *m/z* = 156 (M+H).

Preparación 16

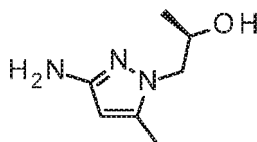
- 10 (2R)-1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol



- 15 Añadir acetonitrilo (41 ml) a una mezcla de 5-metil-3-nitro-1H-pirazol (1,1 g, 8,2 mmol), carbonato potásico (2,3 g, 2,0 equiv.) y (R)-1-cloro-2-propanol (0,92 ml, 1,3 equiv.). Agitar a 85 °C durante una noche. Enfriar a ta. Filtrar y aclarar los sólidos con EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con EtOAc al 50 % en hexanos, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,74 g, 48 %). MS (ES) *m/z* = 186 (M+H).

20 Preparación 17

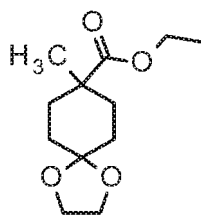
- (2R)-1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol



- 25 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 0,15 g) a un matraz. Añadir una solución de (2R)-1-(5-metil-3-nitro-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (0,74 g, 4,0 mmol) en EtOH (33 ml). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante una noche. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar los sólidos con MeOH. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,58 g, 95 %). MS (ES) *m/z* = 156 (M+H).

30 Preparación 18

- 8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato de etilo



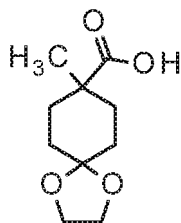
- 35 Combinar diisopropilamina (55 ml, 1,36 equiv.) y 2-metiltetrahidrofurano (500 ml). Enfriar a -20 °C en atmósfera de N₂. Añadir *n*-butillitio 2,5 M en hexanos (150 ml, 1,30 equiv.) gota a gota durante 10 min, después agitar la solución a -20 °C durante otros 15 min. Transferir la solución mediante una cánula durante 20 min a una solución de 1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato de etilo (50 ml, 287 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (500 ml) a -40 °C. Agitar la solución a -40 °C durante diez min. Añadir una solución de yodometano (30 ml, 1,68 equiv.) en 2-metiltetrahidrofurano

40

(60 ml) gota a gota durante diez min. Agitar a -40 °C durante una hora. Dejar calentar lentamente a ta y agitar durante una noche. Inactivar con cloruro de amonio acuoso saturado (150 ml). Separar las capas. Extraer la capa acuosa con éter *terc*-butil metílico (50 ml). Secar las capas orgánicas combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (63,3 g, 97 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,16 (s, 3H), 1,20-1,25 (m, 3H), 1,42-1,66 (m, 6H), 2,07-2,14 (m, 2H), 3,91 (s, 4H), 4,08-4,15 (m, 2H).

Preparación 19

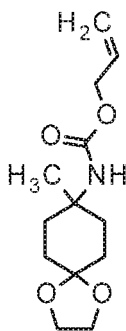
Ácido 8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxílico



Combinar 8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxilato de etilo (20 g, 88 mmol), MeOH (100 ml) e hidróxido sódico 3 M en agua (140 ml). Calentar la mezcla de reacción a reflujo durante una noche. Concentrar al vacío y diluir con agua (150 ml) y éter *terc*-butil metílico (50 ml). Separar las capas y desechar la capa orgánica. Acidificar la capa acuosa con ácido clorhídrico acuoso al 3 % p/p para ajustar el pH a 2. Extraer con éter *terc*-butil metílico (3 x 100 ml). Secar los orgánicos combinados sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido oleoso de color amarillo (12,6 g, 72 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,25 (s, 3H), 1,47-1,60 (m, 2H), 1,65-1,70 (m, 4H), 2,08-2,17 (m, 2H), 3,93 (s, 4H).

Preparación 20

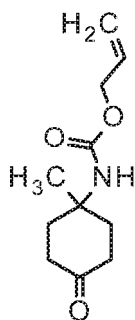
(8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]dec-8-il)carbamato de prop-2-en-1-ilo



Combinar ácido 8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-8-carboxílico (12 g, 60 mmol) y acetonitrilo (200 ml). Añadir trietilamina (25,5 ml, 3,11 equiv.) y difenilfosforil azida (15 ml, 1,18 equiv.). Agitar a ta en atmósfera de N₂ durante dos horas. Añadir alcohol alílico (25 ml, 6,25 equiv.). Agitar la mezcla de reacción a reflujo durante una noche. Concentrar al vacío y diluir con agua (150 ml) y éter *terc*-butil metílico (150 ml). Separar las capas. Extraer la capa acuosa con éter *terc*-butil metílico (2 x 100 ml). Secar los orgánicos combinados sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color pardo (10,8 g, 71 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,34 (s, 3H), 1,57-1,69 (m, 6H), 1,98-2,11 (m, 2H), 3,92-3,93 (m, 4H), 4,48-4,66 (m, 3H), 5,16-5,32 (m, 2H), 5,82-5,99 (m, 1H).

Preparación 21

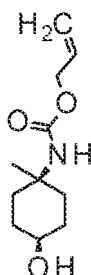
(1-metil-4-oxociclohexil)carbamato de prop-2-en-1-ilo



Combinar (8-metil-1,4-dioxaspiro[4,5]dec-8-il)carbamato de prop-2-en-1-ilo (10,5 g, 41 mmol), acetona (30 ml) y agua (3 ml). Añadir ácido clorhídrico al 35 % (2,7 ml). Agitar a ta durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío para eliminar la acetona. Diluir con éter *tert*-butil metílico (100 ml). Basificar con carbonato potásico acuoso 6 M para ajustar el pH a 8. Separar las capas. Extraer la capa acuosa con éter *tert*-butil metílico (2 x 20 ml). Secar los orgánicos combinados sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrar y concentrar al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 20-100 % de éter *tert*-butil metílico en hexanos para dar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro (6,0 g, 69 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,44 (s, 3H), 1,76-1,88 (m, 2H), 2,24-2,51 (m, 6H), 4,54 (d, 2H), 4,78 (s, 1H), 5,20-5,35 (m, 2H), 5,85-6,00 (m, 1H).

Preparación 22

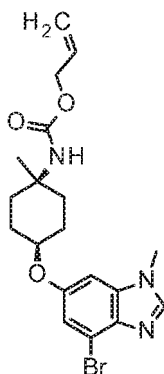
(*Cis*-4-hidroxi-1-metilciclohexil)carbamato de prop-2-en-1-ilo



Añadir tampón de fosfato de monopotasio 0,1 M (pH 7, 500 ml), MgSO₄ (0,12 g), NADP (0,27 g) y cetorreductasa-P1-B10 (0,32 g) a una solución de (1-metil-4-oxociclohexil)carbamato de prop-2-en-1-ilo (32,8 g, 155 mmol) en isopropanol (110 ml). Agitar a 35 °C durante 24 horas. Extraer con EtOAc. Secar los orgánicos sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (32,41 g, 98 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,18-1,50 (m, 7H), 1,57-1,88 (m, 3H), 1,98-2,14 (m, 2H), 3,55-3,65 (m, 1H), 4,46-4,66 (m, 3H), 5,17-5,32 (m, 2H), 5,83-5,96 (m, 1H). Se sabe que el multiplete de protones a 3,55-3,65 ppm está en la configuración *cis*.

Preparación 23

{*Cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]-1-metilciclohexil}carbamato de prop-2-en-1-ilo

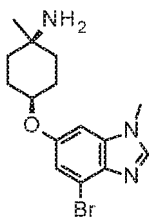


30

Añadir hidróxido sódico acuoso 5 M (270 ml) y bisulfato de tetra(n-butil)amonio (7,50 g, 0,18 equiv.) a una solución de 3-bromo-5-fluoro-N-metil-2-nitroanilina (30,00 g, 120 mmol) y (*cis*-4-hidroxi-1-metilciclohexil)carbamato de prop-2-en-1-ilo (33,00 g, 1,28 equiv.) en DCM (300 ml). Agitar la mezcla rápidamente a ta durante 24 horas. Añadir hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio (7,50 g, 0,18 equiv.). Agitar rápidamente a ta durante una noche. Diluir con agua (20 ml). Separar las capas. Extraer la capa acuosa con DCM (2 x 150 ml). Lavar los extractos orgánicos combinados con cloruro sódico acuoso al 5 % p/p (200 ml) y agua (200 ml); después concentrar los extractos orgánicos al vacío. Combinar los extractos concentrados y ácido acético (650 ml). Añadir trimetilortoformiato (45 ml). Agitar a 90 °C durante 2,5 h en atmósfera de nitrógeno. Diluir con EtOAc (500 ml). Filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas. Lavar el lecho con EtOAc. Concentrar los filtrados combinados al vacío. Diluir con fosfato dipotásico acuoso 2 M (60 ml) y 2-metiltetrahidrofurano (60 ml). Agitar durante 20 min, después filtrar a través de tierra de diatomeas. Separar las capas. Extraer la capa acuosa con 2-metiltetrahidrofurano (2 x 20 ml). Combinar los extractos orgánicos, lavar con agua y concentrar al vacío. Diluir con 1-metil-2-pirrolidinona (100 ml) y agitar para obtener una mezcla homogénea. Añadir gota a gota la mezcla a agua (1200 ml) durante 30 min. Agitar durante 30 min, filtrar para recoger el sólido y lavar el sólido con agua. Disolver el sólido en 2-metiltetrahidrofurano (250 ml) y concentrar al vacío. Diluir la solución con isopropanol (3 x 150 ml) y concentrar al vacío. Diluir la solución con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml) y concentrar al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite residuo aceitoso de color pardo (31,5 g, 74 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 422/424 (\text{M}+\text{H})$.

20 Preparación 24

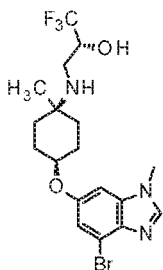
Cis-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]-1-metilciclohexamina



Combinar {*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]-1-metilciclohexil}carbamato de prop-2-en-1-ilo (30 g, 71 mmol), bis(dibencilidenoacetona)paladio (0,50 g, 0,017 equiv.), 1,4-bis(difenilfosfino)butano (0,50 g, 0,022 equiv.) y ácido tiosalicílico (15 g, 1,90 equiv.) en 2-metiltetrahidrofurano (700 ml). Calentar la mezcla de reacción a 50 °C durante una hora. Diluir con agua (300 ml) y éter *terc*-butil metílico (300 ml). Acidificar con ácido clorhídrico al 35 % para ajustar el pH a 2. Separar las capas y desechar la capa orgánica. Diluir la capa acuosa con EtOAc (20 ml) y agitar durante diez min. Separar las capas y descartar las orgánicas. Diluir la capa acuosa con DCM (150 ml) y agitar durante diez min. Separar las capas y descartar la capa orgánica. Basificar la capa acuosa con hidróxido sódico. Filtrar; recoger el sólido; después someter el sólido resultante a cromatografía de fase normal, eluyendo con MeOH amoniacado 2 M al 5 % en DCM, para dar el compuesto del título (12,0 g, 50 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 338/340 (\text{M}+\text{H})$.

35 Preparación 25

(2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]-1-metilciclohexil}amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol



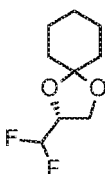
Combinar *cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]-1-metilciclohexanamina (11,6 g, 34 mmol), (2R)-2-(trifluorometil)oxirano (4,00 g, 1,05 equiv.), EtOH (45 ml) y agua (45 ml) en un reactor a presión de vidrio. Cerrar al vacío y calentar la mezcla de reacción a 90 °C durante una hora. Dejar enfriar a ta. Añadir (2R)-2-(trifluorometil)oxirano (0,44 g, 0,12 equiv.). Cerrar al vacío y calentar la mezcla de reacción a 90 °C durante una hora. Concentrar al vacío. Diluir con agua (100 ml), éter *terc*-butil metílico (20 ml) y EtOAc (20 ml). Acidificar con ácido clorhídrico acuoso al 35 % para ajustar el pH a 2 y agitar hasta conseguir la completa disolución. Separar las capas y desechar la capa orgánica. Diluir la capa acuosa con éter *terc*-butil metílico (40 ml). Separar las capas y desechar la capa orgánica. Basificar la

capa acuosa con hidróxido sódico acuoso al 50 % p/p para ajustar el pH a 10. Extraer la capa acuosa con EtOAc (2 x 50 ml). Combinar los extractos orgánicos y concentrar al vacío. Cristalizar un sólido con EtOAc (50 ml). Filtra para recoger el sólido, después lavar el sólido resultante con EtOAc para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (6,3 g, 41 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 450/452$ (M+H).

5 Concentrar el filtrado a partir de la cristalización del licor madre para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con MeOH amoniacoado 2 M al 5 % en EtOAc, para dar más compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (3,3 g, 21 %). MS (ES) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}) 450/452$ (M+H).

10 Preparación 26

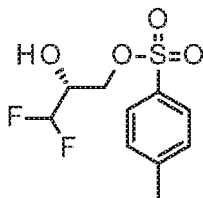
(2R)-2-(difluorometil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decano



15 Disolver (3R)-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-3-carbaldehído (15,98 g, 89,19 mmol) en DCM (80 ml). Colocar en atmósfera de N_2 y enfriar la solución a 0 °C. Añadir cuidadosamente trifluoruro de dietilaminoazufre (15 ml, 1,2 equiv.) gota a gota. Dejar calentar lentamente a ta y agitar durante una noche. Verter lentamente la mezcla en una mezcla en agitación de hielo picado, bicarbonato sódico acuoso saturado y DCM. Añadir fosfato dipotásico (5 g) y adiciones de
20 carbonato potásico en porciones, manteniendo el pH ~7-8, hasta que no se observe más burbujeo. Agitar durante 20 min. Separar las capas. Extraer la capa acuosa con DCM (3x). Lavar los extractos orgánicos combinados con bisulfito sódico acuoso 1 M y cloruro sódico acuoso saturado. Secar los orgánicos sobre Na_2SO_4 seco, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un aceite de color ámbar (17,37 g, 93 %). GC-MS $m/z = 192$.

25 Preparación 27

4-metilbencenosulfonato de (2R)-3,3-difluoro-2-hidroxiopropilo

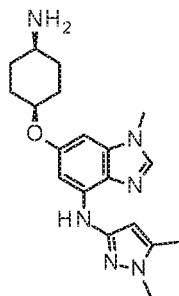


30 Disolver (2R)-2-(difluorometil)-1,4-dioxaspiro[4,5]decano (9,08 g, 47,2 mmol) en MeOH (250 ml). Añadir ácido p-toluenosulfónico monohidrato (0,70 g, 0,1 equiv.). Agitar a ta durante una semana. Añadir bicarbonato sódico (0,60 g). Agitar durante una hora. Añadir gel de sílice y trimetilamina (3 ml). Agitar durante diez min. Concentrar al vacío y purificar por cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 15-100 % de EtOAc en hexanos, para dar
35 (2R)-3,3-difluoropropan-1,2-diol en forma de un aceite de color amarillo (2,95 g).

40 Disolver (2R)-3,3-difluoropropan-1,2-diol (2,0 g, 15,2 mmol) en DCM (40 ml). Colocar en atmósfera de nitrógeno y enfriar la solución a 0 °C. Añadir 2,6-lutidina (8,0 ml, 4,5 equiv.). Añadir cloruro de *p*-toluenosulfonilo (3,0 g, 1,0 equiv.) en porciones. Dejar calentar lentamente a ta y agitar durante dos días. Enfriar a -78 °C y añadir trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (1,5 ml, 0,5 equiv.) gota a gota. Dejar calentar a 0 °C durante 40 min. Añadir trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (1,5 ml, 0,5 equiv.) gota a gota. Agitar durante 30 min e inactivar con MeOH (5 ml). Diluir con DCM y añadir una solución de fosfato sódico (4,9 g) en agua (75 ml). Ajustar el pH a ~3 con bisulfato potásico acuoso 2 M. Separar las capas. Extraer la capa acuosa con éter dietílico. Secar los extractos orgánicos sobre
45 Na_2SO_4 anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío. Añadir etilenglicol (1 ml) y gel de sílice (~20 g). Concentrar al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 20-100 % de B en A (A: hexanos, B: 6:3:1 de hexanos:DCM:THF), para dar el compuesto del título (1,37 g, 16 %). GC-MS $m/z = 266$.

50 Preparación 28

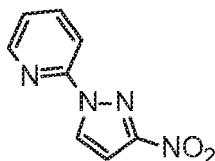
6-[(*cis*-4-aminociclohexil)oxi]-N-(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)-1-metil-1H-benzimidazol-4-amina



- 5 Combinar *cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexanamina (25,70 g, 79,27 mmol), 1,5-dimetil-1H-pirazol-3-amina (9,08 g, 1,0 equiv.), carbonato potásico (28,48 g, 2,6 equiv.), 2-(dicrohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-triiisopropil-1,1'-bifenilo (8,60 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (3,63 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,14 ml) en alcohol *terc*-butílico (250 ml). Calentar a reflujo durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Añadir DCM y agua; separar las capas. Secar las orgánicas sobre sulfato de magnesio anhidro, filtrar y concentrar al vacío. Triturar en EtOAc y hexanos para dar un sólido de color castaño. Someter el sólido de color castaño a cromatografía de fase normal, eluyendo con hexanos, después MeOH al 5 % en DCM, después MeOH amoniacado 2 M al 20 % en DCM, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color castaño (21,71 g, 77 %). MS (ES) m/z = 355 (M+H).

Preparación 29

- 15 2-(3-nitro-1H-pirazol-1-il)piridina



- 20 En cada uno de dos recipientes separados, combinar 3-nitro-1H-pirazol (3,0 g, 27 mmol), 2-fluoropiridina (2,9 ml, 1,3 equiv.) y trietilamina (4,6 ml, 1,2 equiv.) en 1-metil-2-pirrolidinona (20 ml). Cerrar herméticamente y agitar a 180 °C durante una noche. Enfriar a ta. Combinar las mezclas de reacción y diluir con agua. Filtrar para recoger un sólido, lavar el sólido con agua y secar al vacío para dar el compuesto del título (5,9 g, 58 %). MS (ES) m/z = 191 (M+H).

Preparación 30

1-piridin-2-il-1H-pirazol-3-amina

- 30 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 1,9 g) a un matraz. Purgar con N₂ y añadir EtOH (200 ml). Añadir 2-(3-nitro-1H-pirazol-1-il)piridina (2,5 g, 13 mmol). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante una noche. Añadir una pequeña cantidad de tierra de diatomeas y agitar durante min. Filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas y lavar el lecho con EtOH. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (1,8 g, 85 %). MS (ES) m/z = 161 (M+H).

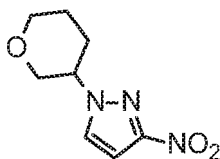
Preparación 31

1-(metilsulfonyl)-3-nitro-1H-pirazol

- 40 Combinar 3-nitro-1H-pirazol (3,0 g, 27 mmol), cloruro de metanosulfonyl (2,5 ml, 1,2 equiv.) y trietilamina (4,4 ml, 1,2 equiv.) en DCM (20 ml). Agitar a ta durante dos horas. Diluir con DCM y bicarbonato sódico acuoso saturado. Separar las capas. Lavar la capa orgánica con agua y salmuera. Secar la capa orgánica sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (3,7 g, 73 %). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 3,74 (s, 3H), 7,30 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 8,55 (d, J = 2,9 Hz, 1H).

Preparación 32

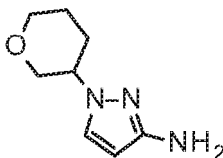
3-nitro-1-tetrahidro-2H-piran-3-il-1H-pirazol



5 Combinar tetrahidropiran-3-ol (1,3 g, 13 mmol), 1-(metilsulfonyl)-3-nitro-1H-pirazol (2,4 g, 1,0 equiv.) y carbonato de cesio (4,8 g, 1,2 equiv.) en acetonitrilo (40 ml). Agitar a 90 °C durante una noche. Concentrar la mezcla al vacío. Diluir con EtOAc y filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase inversa C-18 eluyendo con un gradiente del 0 % al 100 % de (0,1 %) ácido fórmico en acetonitrilo) en (ácido fórmico al 0,1 % en agua), para dar el compuesto del título (0,35 g, 14 %). MS (ES) m/z = 198 (M+H).

10 Preparación 33

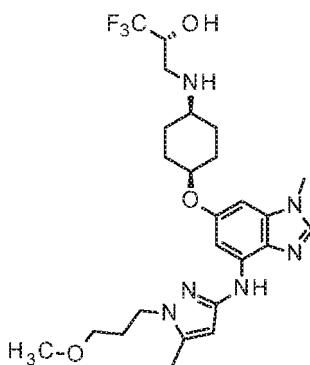
1-(tetrahidro-2H-piran-3-il)-1H-pirazol-3-amina



15 Añadir paladio sobre carbón (10 % p/p, 0,10 g) a un matraz. Purgar con N₂ y añadir EtOH (20 ml). Añadir 3-nitro-1-tetrahidro-2H-piran-3-il-1H-pirazol (0,30 g, 1,5 mmol). Agitar a ta en atmósfera de H₂ (globo) durante dos h. Filtrar a través de tierra de diatomeas y lavar con EtOH. Concentrar el filtrado al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color gris (0,24 g, 94 %). MS (ES) m/z = 168 (M+H).

20 Ejemplo 1

25 (2R)-1,1,1-trifluoro-3-({cis-4-[(4-[[1-(3-metoxipropil)-5-metil-1H-pirazol-3-il]amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol



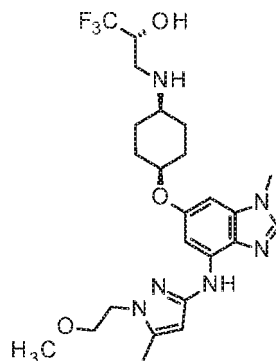
30 Combinar (2R)-3-({cis-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (4,0 g, 9,2 mmol), 1-(3-metoxipropil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina (2,2 g, 1,4 equiv.), carbonato potásico (3,2 g, 2,5 equiv.), 2-(di-*tert*-butilfosfino)-2',4',6'-triosopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,92 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,87 g, 0,10 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *tert*-butílico (46 ml). Calentar a 90 °C durante una noche. Filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas y lavar el lecho con EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con MeOH al 5 % en DCM, para dar el producto en bruto. Volver a purificar el producto en bruto por cromatografía de fase inversa, eluyendo con un gradiente del 15-60 % de B en A (A: bicarbonato de amonio 10 mM en MeOH, B: acetonitrilo). Concentrar las fracciones que contienen el producto para eliminar la mayoría del acetonitrilo. Añadir EtOAc y separar las capas. Lavar la capa orgánica con cloruro sódico acuoso saturado, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar el filtrado al vacío. Volver a purificar el producto por cromatografía de fase normal, eluyendo con un 5 % de MeOH en DCM, para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (2,4 g, 49 %).

40 MS (ES) m/z = 525 (M+H).

Ejemplo 2

(2R)-1,1,1-trifluoro-3-({*cis*-4-[(4-{{1-(2-metoxietil)-5-metil-1H-pirazol-3-il}amino)-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil}amino)propan-2-ol

5



Combinar (2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (1,4 g, 3,2 mmol), 1-(2-metoxietil)-5-metil-1H-pirazol-3-amina (0,69 g, 1,4 equiv.), carbonato potásico (1,1 g, 2,6 equiv.), 2-(díciclohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (0,35 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,15 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (32 ml). Calentar a reflujo durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Añadir DCM y agua; separar las capas. Filtrar la capa orgánica a través del material HM-N de ISOLUTE®, lavar con DCM y EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 30-100 % de B en A (A: DCM, B: MeOH amoniacado 2 M al 15 % en DCM), para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (0,91 g, 56 %). MS (ES) m/z = 511 (M+H).

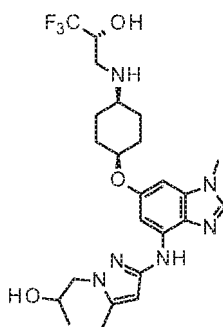
10

15

Ejemplo 3

(2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[(4-{{1-(2-hidroxi)propil)-5-metil-1H-pirazol-3-il}amino)-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino]propan-2-ol

20



Combinar (2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil}amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,35 g, 0,80 mmol), 1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (0,14 g, 1,1 equiv.), carbonato potásico (0,28 g, 2,5 equiv.), 2-(di-*terc*-butilfosfino)-2',4',6'-trisisopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,12 g, 0,30 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,055 g, 0,075 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (5,3 ml). Calentar a 100 °C durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase inversa C-18, eluyendo con un gradiente de del 0 %-80 % de acetonitrilo en (bicarbonato de amonio 10 mM en metanol). Concentrar las fracciones que contienen el producto (en forma de una mezcla de isómeros) al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (0,29 g, 71 %). MS (ES) m/z = 511 (M+H).

25

30

35

Separar los isómeros en la mezcla usando las condiciones de cromatografía quiral siguientes para dar:

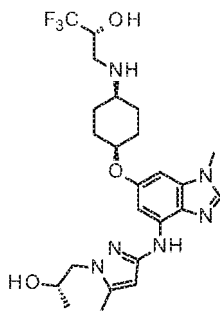
Primer enantiómero de elución 1 (0,12 g, 99 % de ee). MS (ES) m/z = 511 (M+H), 75 %/25 % CO₂/isopropanol, 5 ml/min, 4,6 x 150 mm, Chiralpak AD-H

Segundo enantiómero de elución 2 (0,11 g, 97 % de ee). MS (ES) m/z = 511 (M+H), 75 %/25 % CO₂/isopropanol, 5 ml/min, 4,6 x 150 mm, Chiralpak AD-H

40

Ejemplo 4

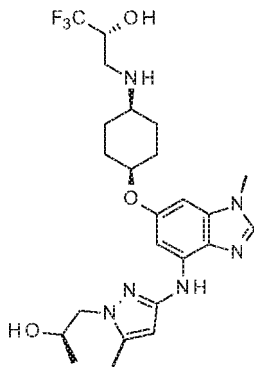
5 (2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[(1-[(2S)-2-hidroxiopropil]-5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]amino]propan-2-ol



10 Combinar (2R)-3-[(*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-6-il)oxi]ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,40 g, 0,92 mmol), (2S)-1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (0,17 g, 1,2 equiv.), carbonato potásico (0,33 g, 2,6 equiv.), 2-(dicrohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trioisopropil-1,1'-bifenilo (0,099 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,042 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (10 ml). Cerrar herméticamente con un tapón de rosca. Calentar la mezcla en un reactor de microondas a 140 °C durante 60 min. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Añadir DCM y agua; separar las capas. Filtrar la capa orgánica a través del material HM-N de ISOLUTE®, lavar el material con DCM y EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Triturar el residuo con EtOAc/hexanos para dar el compuesto del título (0,44 g, 95 %). MS (ES) *m/z* = 511 (M+H).

Ejemplo 5

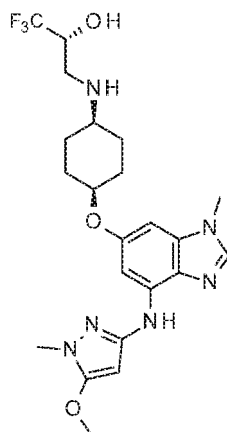
20 (2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[(1-[(2R)-2-hidroxiopropil]-5-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]amino]propan-2-ol



25 Combinar (2R)-3-[(*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzimidazol-6-il)oxi]ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,15 g, 0,34 mmol), (2R)-1-(3-amino-5-metil-1H-pirazol-1-il)propan-2-ol (0,064 g, 1,2 equiv.), carbonato potásico (0,12 g, 2,6 equiv.), 2-(dicrohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trioisopropil-1,1'-bifenilo (0,037 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,016 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (10 ml). Cerrar herméticamente con un tapón de rosca. Calentar la mezcla en un reactor de microondas a 140 °C durante 60 min. Concentrar la mezcla al vacío para proporcionar un residuo. Añadir DCM y agua al residuo y separar las capas. Filtrar la capa orgánica a través del material HM-N de ISOLUTE®; lavar el material con DCM y EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío. Triturar con EtOAc/hexanos para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color castaño (0,11 g, 62 %). MS (ES) *m/z* = 511 (M+H).

Ejemplo 6

40 (2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[(5-metoxi-1-metil-1H-pirazol-3-il)amino]-1-metil-1H-benzimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]amino]propan-2-ol

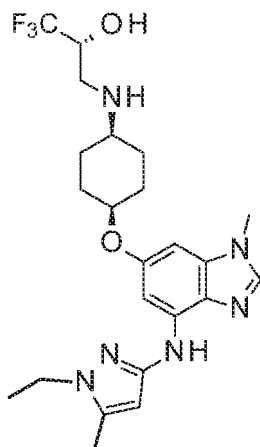


Añadir 2-metilbutan-2-ol (120 ml) a una mezcla de (2R)-3-((*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (10 g, 22,9 mmol), 5-metoxi-1-metil-pirazol-3-amina (3,6 g, 28,8 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (1,8 g, 2 mmol), di-*terc*-butil(2',4',6'-triisopropil-3,6-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-il)fosfina (1,3 g, 2,4 mmol) y carbonato potásico (9 g, 65 mmol). Desgasificar la mezcla burbujeando gas N₂ a través de la mezcla y añadiendo después ácido acético (118 ul, 2 mmol). Calentar y agitar la mezcla en atmósfera de N₂ a 100 °C durante 20 h. Enfriar a ta; evaporar el disolvente; después añadir EtOAc (100 ml), agua (50 ml) y carbón (1 g). Agitar la mezcla durante 15 min y filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas. Recoger el filtrado y separar la capa orgánica. Añadir agua (100 ml) y ácido clorhídrico concentrado para ajustar el pH a 2. Añadir carbón (1,5 g), agitar la mezcla 30 min y filtrar la mezcla a través de tierra de diatomeas. Transferir el filtrado a un embudo de separación y aislar la capa acuosa. Añadir solución concentrada de hidróxido de amonio sobre la capa acuosa para ajustar el pH a 10 para proporcionar un sólido de color crema claro. Someter el sólido cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de cloruro de metileno y MeOH (95:5). Recoger las fracciones deseadas y evaporar el disolvente para proporcionar el compuesto del título en forma de un material de color crema claro (6,5 g, 13 mmol) 64 % de rendimiento.

Cristalizar el compuesto del título a partir de ciclopentil metil éter (45 ml) para dar (2R)-1,1,1-trifluoro-3-[[4-[7-[(5-metoxi-1-metil-pirazol-3-il)amino]-3-metil-benzoimidazol-5-il]oxi]ciclohexil]amino]propan-2-ol (3,2 g, 6,5 mmol). Agitar la mezcla a 22 °C durante 18 h. Evaporar el disolvente y secar el sólido de color blanco hasta peso constante para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (3,2 g, 6,4 mmol) con un 99 % de rendimiento. MS (*m/z*): 483,2 (M+H). RMN ¹H (300,16 MHz, DMSO): 8,13 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,46 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 6,46 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 5,49 (s, 1H), 4,45 (s, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 2,75-2,67 (m, 2H), 1,99-1,91 (m, 2H), 1,67-1,54 (m, 7H).

Ejemplo 7

(2R)-3-[[*cis*-4-((4-(etil-5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil]amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol

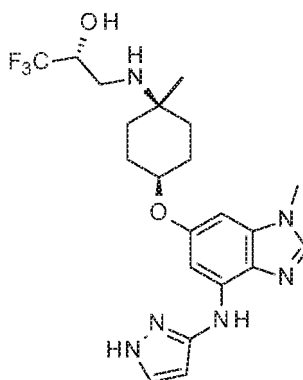


Combinar (2R)-3-((*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol

(1,36 g, 3,12 mmol), 1-etil-5-metil-1H-pirazol-3-amina (0,78 g, 2,0 equiv.), carbonato potásico (1,12 g, 2,6 equiv.), 2-(diciclohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (0,34 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,14 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (30 ml). Calentar a reflujo durante una noche. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Añadir DCM y agua; separar las capas. Filtrar la capa orgánica a través del material HM-N de ISOLUTE®, lavando con DCM. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Triturar el residuo en EtOAc y hexanos para dar el compuesto del título (1,40 g, 94 %). MS (ES) $m/z = 481$ (M+H).

Ejemplo 8

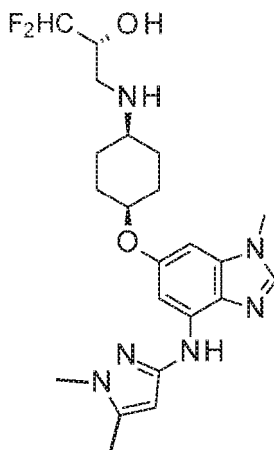
(2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-1-metil-4-[[1-metil-4-(1H-pirazol-3-ilamino)-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)amino]propan-2-ol



Combinar (2R)-3-[(*cis*-4-[[4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]-1-metilciclohexil)amino]-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,91 g, 2,02 mmol), 3-aminopirazol (0,29 g, 1,70 equiv.), carbonato potásico (0,73 g, 2,6 equiv.), 2-(diciclohexilfosfino)3,6-dimetoxi-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenilo (0,22 g, 0,20 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,093 g, 0,050 equiv.) y ácido acético (0,01 ml) en alcohol *terc*-butílico (20 ml). Calentar a reflujo la mezcla durante una noche. Concentrar la mezcla al vacío. Añadir DCM y agua; separar las capas. Filtrar la capa orgánica a través del material HM-N de ISOLUTE®, lavando con DCM. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 50-100 % de B en A (A: éter *terc*-butílico, B: MeOH amoniacoado 7 M al 15 % en DCM), para dar el compuesto del título (0,67 g, 74 %). MS (ES) $m/z = 453$ (M+H).

Ejemplo 9

(2R)-3-[(*cis*-4-[[4-[[1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il]amino]-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)amino]-1,1-difluoropropan-2-ol



Combinar 4-metilbencenosulfonato de (2R)-3,3-difluoro-2-hidroxiopropilo (0,38 g, 1,31 mmol) y 6-[(*cis*-4-aminociclohexil)oxi]-N-(1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)-1-metil-1H-benzoimidazol-4-amina (0,61 g, 1,30 equiv.) en acetonitrilo (3 ml) y 2-propanol (3 ml). Añadir N,N-diisopropiletilamina (0,50 ml, 2,0 equiv.) y yoduro sódico (0,015 g, 0,1 equiv.). Calentar a 65 °C durante una noche. Añadir 4-metilbencenosulfonato de (2R)-3,3-difluoro-2-hidroxiopropilo

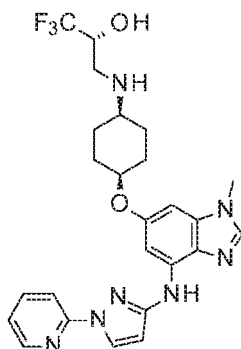
(0,065 g, 0,22 mmol) y calentar a 65 °C durante una noche. Filtrar a través de tierra de diatomeas. Lavar los sólidos con EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío. Purificar por cromatografía de fase inversa, eluyendo con un gradiente del 0-90 % de acetonitrilo en agua. Concentrar las fracciones que contienen el producto al vacío para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (0,40 g, 67 %). MS (ES) $m/z = 449$ (M+H).

5

Ejemplo 10

(2R)-1,1,1-trifluoro-3-({*cis*-4-[(1-metil-4-[(1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino)-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol

10



Combinar (2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (1,8 g, 4,1 mmol), 1-piridin-2-il-1H-pirazol-3-amina (0,86 g, 1,3 equiv.), carbonato potásico (1,7 g, 2,9 equiv.), 2-(di-*tert*-butilfosfina)-2',4',6'-triisopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,83 g, 0,41 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,38 g, 0,10 equiv.) y ácido acético (0,03 ml) en alcohol *tert*-butílico (22 ml). Calentar la mezcla a 90 °C durante tres horas. Enfriar la mezcla a ta. Filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas y lavar el lecho con EtOAc. Concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-10 % de MeOH en DCM, para dar el compuesto del título (1,34 g, 63 %). MS (ES) $m/z = 516$ (M+H).

15

20

El material de base libre cristalino se puede obtener disolviendo el material sólido, que se prepara sustancialmente como se ha descrito anteriormente, en 2 butanona (100 % en masa), calentando después la mezcla resultante a 65 °C. Dejar enfriar la mezcla a 20 °C y añadir heptano (100 % en masa) para inducir la participación. Recoger el sólido resultante y lavar con heptano, secar al aire durante 15 minutos, después secar en el horno a 40 °C durante una noche para proporcionar el compuesto del título en forma de una base libre cristalina, anhidra, con un rendimiento del 62 %.

25

Difracción de rayos X en polvo del Ejemplo 10

Los patrones XRD de los sólidos cristalinos se obtienen en un difractor de rayos X en polvo D4 Endeavor de Bruker, equipado con una fuente de CuK α ($\lambda = 1,54060$ Å) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 40° en 2 θ , con un tamaño de paso de 0,0087° en 2 θ y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/paso y con 0,6 mm de divergencia, antidisipación fija de 5,28 mm y ranuras de detección de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie suave usando un portaobjetos de vidrio. Es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los máximos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Donde está presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades máximas están alteradas, pero las posiciones máximas características del polimorfo no han cambiado. Véase, por ejemplo, The U.S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official, 1 de mayo de 2015. Además, también es bien conocido en la técnica de la cristalografía que para cualquier forma cristalina dada, las posiciones máximas angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones máximas pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se ha analizado la muestra, al desplazamiento de la muestra o a la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición máxima de $\pm 0,2$ en 2 θ tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer basándose en cualquier combinación única de máximos distintivos (en unidades de ° 2 θ), habitualmente los máximos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan basándose en los máximos convencionales NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-theta.

45

50

Por lo tanto, una muestra preparada del compuesto de base libre del ejemplo 10 se caracteriza por un patrón de XRD usando radiación CuK α que tiene máximos de difracción (valores 2-theta) como se describen en la tabla 1 a

continuación. Específicamente, el patrón contiene un máximo a 20,5 junto con uno o más de los máximos seleccionados entre el grupo que consiste en 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 22,9 y 23,6 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

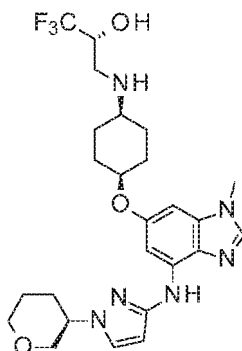
5

Tabla 1

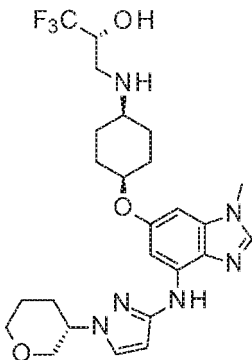
Máximos de difracción de rayos X en polvo del ejemplo 10		
Máximo	Ángulo 2theta	% de Intensidad
1	11,3	21 %
2	13,2	37 %
3	14,8	22 %
4	15,5	63 %
5	16,3	19 %
6	18,1	63 %
7	18,3	75 %
8	18,5	56 %
9	19,0	30 %
10	19,3	27 %
11	20,5	100 %
12	20,8	19 %
13	22,3	16 %
14	22,9	86 %
15	23,3	30 %
16	23,6	49 %
17	23,7	45 %
18	24,7	36 %
19	25,5	28 %
20	26,5	33 %
21	28,3	19 %
22	31,0	17 %

Ejemplos 11A y 11B

10 (2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[(3R)-tetrahydro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il}amino)-1H-benzimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)amino]propan-2-ol



(2R)-1,1,1-trifluoro-3-[(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[(3S)-tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)amino]propan-2-ol



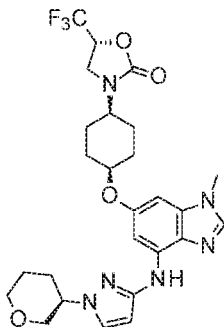
5

Primero preparar los compuestos en forma de una mezcla racémica. Combinar (2R)-3-({*cis*-4-[(4-bromo-1-metil-1H-benzoimidazol-6-il)oxi]ciclohexil)amino)-1,1,1-trifluoropropan-2-ol (0,62 g, 1,2 equiv.), 1-(tetrahidro-2H-piran-3-il)-1H-pirazol-3-amina (0,20 g, 1,2 mmol), carbonato potásico (0,42 g, 2,5 equiv.), 2-(di-*tert*-butilfosfina)-2',4',6'-triisopropil-3,6-dimetoxi-1,1'-bifenilo (0,18 g, 0,30 equiv.), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) (0,085 g, 0,075 equiv.) y ácido acético (0,02 ml) en alcohol *tert*-butílico (6 ml). Calentar a 100 °C durante siete h. Dejar enfriar la mezcla de reacción a ta. Concentrar la mezcla de reacción al vacío. Diluir con EtOAc. Filtrar a través de un lecho de tierra de diatomeas y lavar el lecho con EtOAc. Añadir bicarbonato sódico acuoso saturado al filtrado. Separar las capas. Lavar la capa orgánica con agua y salmuera. Secar la capa orgánica sobre MgSO₄ anhidro, filtrar y concentrar el filtrado al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-30 % de MeOH en DCM, para dar el compuesto del título (0,31 g, 49 %). MS (ES) *m/z* = 523 (M+H).

20

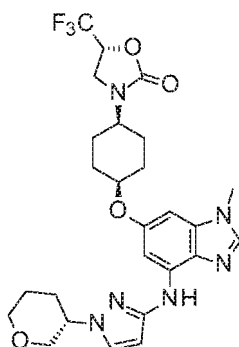
Separar los isómeros preparando primero el derivado de 5-(trifluorometil)oxazolidin-2-ona:

(5R)-3-(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[(3R)-tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona, y



25

(5R)-3-(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[(3S)-tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil)-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona



Combinar (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(1,3-oxazolidin-2-yl)-4-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol (0,25 g, 0,42 mmol), 1,1'-carbonildiimidazol (0,14 g, 2,0 equiv.) y 4-dimetilaminopiridina (0,011 g, 0,21 equiv.) en DCM (2 ml). Agitar a ta durante tres días. Concentrar al vacío para proporcionar un residuo. Someter el residuo a cromatografía de fase normal, eluyendo con un gradiente del 0-20 % de MeOH en DCM, para dar la mezcla racémica de (5R)-3-(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona. Separar los isómeros por cromatografía quiral usando 60 %/40 % de CO₂/isopropanol, 5 ml/min, 4,6 x 150 mm, Lux Amylose-2.

Isómero 1 (0,10 g, 99 % de ee). Tiempo de retención 2,98 min. MS (ES) m/z = 549 (M+H)

Isómero 2 (0,10 g, 99 % de ee). Tiempo de retención 4,83 min. MS (ES) m/z = 549 (M+H)

Isómero 1

(2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(1,3-oxazolidin-2-yl)-4-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol

Combinar (5R)-3-(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona (Isómero 1) (0,080 g, 0,15 mmol) y trimetilsilanolato de potasio (0,041 g, 2,0 equiv.) en THF (2 ml). Agitar a 65 °C durante tres días. Añadir trimetilsilanolato de potasio (0,018 g, 1,0 equiv.). Agitar a 65 °C durante una noche. Dejar enfriar a ta. Diluir con unas gotas de agua y concentrar al vacío. Purificar por cromatografía de fase inversa C-18 usando un gradiente de 0 %-100 % de acetonitrilo (bicarbonato de amonio 10 mM en metanol), para dar el compuesto del título (0,055 g, 72 %). MS (ES) m/z = 523 (M+H).

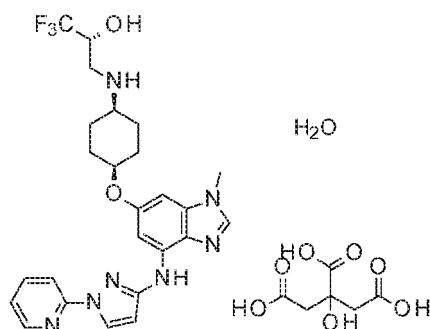
Isómero 2

(2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(1,3-oxazolidin-2-yl)-4-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol

Combinar (5R)-3-(*cis*-4-[[1-metil-4-({1-[tetrahidro-2H-piran-3-il]-1H-pirazol-3-il)amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi)ciclohexil]-5-(trifluorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona (Isómero 2) (0,080 g, 0,15 mmol) y trimetilsilanolato de potasio (0,040 g, 2,0 equiv.) en THF (2 ml). Agitar a 65 °C durante tres días. Añadir trimetilsilanolato de potasio (0,018 g, 1,0 equiv.). Agitar a 65 °C durante una noche. Dejar enfriar a ta. Diluir con unas gotas de agua y concentrar al vacío. Purificar por cromatografía de fase inversa C-18 usando un gradiente del 0 %-100 % de acetonitrilo (bicarbonato de amonio 10 mM en metanol), para dar el compuesto del título (0,058 g, 76 %). MS (ES) m/z = 523 (M+H).

Ejemplo 12

2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((1S)-1-(1,3-oxazolidin-2-yl)-4-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzoimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato (1:1:1)



Añadir 1,23 g de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((*cis*-4-[(1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino)-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol a 10 ml de acetona al 88 % mientras se agita a 1000 rpm/70 °C para obtener una suspensión de color blanco. Añadir 510 mg de ácido cítrico gota a gota. La suspensión de color blanco se convierte en una solución de color amarillento. Dejar de calentar y agitar. Durante la siguiente hora, se forma lentamente un sólido de color amarillo. Aislar el sólido de color amarillo claro por filtración al vacío. Secar la muestra en el filtro en una corriente de aire durante 20 minutos para producir el compuesto del título. (1,62 g, 93,6 %)

10 Difracción de rayos X en polvo del ejemplo 12:

Los patrones XRD de los sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de rayos X en polvo D4 Endeavor de Bruker, equipado con una fuente de CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) y un detector Vantec, que opera a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 40° en 2θ , con un tamaño de paso de 0,0087° en 2θ y una velocidad de escaneado de 0,5 segundos/paso y con 0,6 mm de divergencia, antidispersión fija de 5,28 mm y ranuras de detección de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie suave usando un portaobjetos de vidrio. Es bien conocido en la técnica de la cristalografía que, para cualquier forma de cristal dada, las intensidades relativas de los máximos de difracción pueden variar debido a la orientación preferida que resulta de factores tales como la morfología y el hábito del cristal. Donde está presentes los efectos de la orientación preferida, las intensidades máximas están alteradas, pero las posiciones máximas características del polimorfo no han cambiado. Véase, por ejemplo, The US. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official, 1 de mayo de 2015. Además, también es bien conocido en la técnica de la cristalografía que para cualquier forma cristalina dada, las posiciones máximas angulares pueden variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones máximas pueden cambiar debido a una variación en la temperatura o humedad a la que se ha analizado la muestra, al desplazamiento de la muestra o a la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad en la posición máxima de $\pm 0,2$ en 2θ tomará en cuenta estas variaciones potenciales sin impedir la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina se puede hacer basándose en cualquier combinación única de máximos distintivos (en unidades de ° 2θ), habitualmente los máximos más prominentes. Los patrones de difracción de la forma cristalina, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan basándose en los máximos convencionales NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-theta.

Un patrón XRD de 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((*cis*-4-[(1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino)-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol)hidrato (1:1:1) usando radiación CuK α proporciona máximos de difracción (valores 2-theta) como se describen en la tabla 2 a continuación y en particular y en particular que tiene máximos de 17,9 junto con uno o más de los máximos seleccionados entre el grupo que consiste en 26,1, 26,6 y 22,7; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 2

Máximos de difracción de rayos X en polvo del 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((<i>cis</i> -4-[(1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino)-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol)hidrato cristalino (1:1:1)		
Máximo	Ángulo (°2-Theta) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del máximo más intenso)
1	4,7	8 %
2	9,5	40 %

40

(continuación)

Máximos de difracción de rayos X en polvo del 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-({ <i>cis</i> -4-[[1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol hidrato cristalino (1:1:1)		
Máximo	Ángulo (°2-Theta) +/- 0,2°	Intensidad relativa (% del máximo más intenso)
3	10,0	30 %
4	11,2	29 %
5	17,2	45 %
6	17,9	100 %
7	18,7	36 %
8	22,7	52 %
9	26,1	100 %
10	26,6	63 %

Sección Biológica

5 Ensayos enzimáticos *in vitro* de JAK1, JAK2 y JAK3

El ensayo de la cinasa JAK LanthaScreen™ (Invitrogen) se utiliza para determinar la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la actividad de JAK1, JAK2 y JAK3. Estos son formatos de ensayo TR-FRET que utilizan un anticuerpo marcado con terbio de larga duración como especie donadora y GFP-STAT1 como especie aceptora. El uso de la proporción de TR-FRET para controlar la actividad de la cinasa JAK cuando un aumento en la fosforilación de GFP-STAT1 da como resultado un aumento en la proporción de TR-FRET. Realizar la reacción de la cinasa utilizando un volumen de reacción de 12,5 µl en Proxiplate® negra poco profunda de 384 pocillos. Añadir los reactivos para obtener condiciones de reacción finales de 50 ml HEPES pH, Triton X-100 de 1,76 mM, ATP (20,0 µM para JAK1 y JAK3 o 5 µM para JAK2) ensayos enzimáticos, 10,0 mM de MgCl₂, EGTA 1 mM y Brij-35 al 0,01%, GFP-STAT1 0,05 mM, enzima JAK1 14 nM para JAK1, 1,0 nM para JAK2 o 2,5 nM para ensayos enzimáticos JAK3 y DMSO al 4 % y diluciones seriadas del compuesto de prueba (diluido a 1:3 de 20.000 a 1 nM). Después de la adición de ATP/GFP-STAT1, centrifugar las placas de ensayo durante 1 minuto a 1000 revoluciones por minuto (RPM). Dejar que las placas se incuben a TA durante 60 minutos y luego añadir 12,5 µl de un tampón de parada que contenga EDTA 20 mM, transductores de señal anti-fosforilados de terbio 2 nM y activadores de transcripción [fosforilación de tirosina 701 aminoácido] Anticuerpo (Tb-anti-pSTAT1[pTyr701], clorhidrato de tris(hidroximetil)aminoetano 0,67 mM (Trizma®) pH 7,5, NaN₃ al 0,02 % y nonilfenilpolietilenglicol al 0,01 % (Nonidet® P40). Incubar a temperatura ambiente durante 90 min y leer en un lector de placas EnVision® con filtro de excitación de longitud de onda de 340 nm y filtros de emisión de longitudes de onda de 520 nm y 495 nm. Derivar la proporción de la longitud de onda de emisión para el GFP-STAT1 que se mide a 520 nm frente a la emisión a 495 nm para el (Tb-anti-pSTAT1 [pTyr701]. Derivar el valor de CI₅₀ para cada compuesto usando datos de porcentaje de inhibición que se calculan a partir de los datos de reacción en relación con los controles en placa (enzima activa frente a enzima inhibida a 2,0 mM con tofacitinib). Utilizar ACTIVITYBASE® 4.0 para ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de compuesto de diez puntos a una ecuación logística de cuatro parámetros.

30 Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, se ensayaron los compuestos de los Ejemplos en el presente documento. Los compuestos de los ejemplos presentaron una CI₅₀ para JAK1 de menos de 8 nM y son inhibidores selectivos de JAK1 sobre JAK2 o JAK3 *in vitro*. Los compuestos de los Ejemplos 1 y 6 a 10 presentaron la actividad enumerada en la Tabla 3.

35

Tabla 3

N.º de ejemplo	CI ₅₀ de JAK1 (nM)	CI ₅₀ de JAK2 (nM)	CI ₅₀ de JAK3 (nM)
1	3,25±0,99 (n=3)	1200±550 (n=3)	3720±1300 (n=3)
6	5,25±1,11 (n=5)	768±220 (n=5)	2540±510 (n=5)
7	5,43±0,93 (n=3)	901±99 (n=3)	6160±2020 (n=3)
8	1,91±0,75 (n=4)	239±150 (n=4)	1170±470 (n=4)

(continuación)

N.º de ejemplo	CI ₅₀ de JAK1 (nM)	CI ₅₀ de JAK2 (nM)	CI ₅₀ de JAK3 (nM)
9	5,35±0,23 (n=5)	767±39 (n=5)	2140±720 (n=5)
10	1,49±0,49 (n=3)	220±120 (n=3)	660±180 (n=3)

Los datos demuestran que los compuestos de los ejemplos son inhibidores de la enzima JAK1 y selectivos para JAK1 sobre JAK2 y JAK3 *in vitro*.

5

Ensayo basado en células p-STAT3-(p-Tyr705)-IL6-TF-1-JAK1, protocolo AlphaScreen SureFire

El ensayo basado en células JAK1 que se describe a continuación se utiliza para determinar la potencia celular de JAK1 de los compuestos de prueba.

10

Preparación de las células: Mantener sin alimento a células TF-1 en medio DMEM con 0,5 % de 26400 (FBS) y IX Pen/Estrep a 37 °C. Sembrar 100.000 células por pocillo en placas negras BD de 96 pocillos con fondos transparentes. Mantener las placas a temperatura ambiente durante 30-60 minutos antes de incubar durante la noche a 37 °C y el 5 % de CO₂. Contar las células usando el contador Vi-Cell, utilizando una suspensión celular a 100 células/ml y sembrada en placas de 100 µl/pocillo en placas Beckman Dickinson Biocoat (n.º de catálogo 354640).

15

Preparación y tratamiento del compuesto de prueba: Preparar los compuestos a diluciones seriadas de 1:3 en DMSO y diluir más en el medio. Probar los compuestos en un intervalo de concentraciones de 10 puntos de 20.000 a 1 nM. Agregue el compuesto diluido a las placas de células correspondientes. Incubar las placas a 37 °C durante 20 min. Agregar la solución de IL6 a la concentración final de 30 ng/ml a las placas de células correspondientes y continuar incubando a 37 °C durante 30 min. Retirar el medio y agregar 50 µl de tampón de lisis a 1x a cada pocillo.

20

Detección de pSTAT3: Realizar las siguientes etapas de manera secuencial: hacer una mezcla de aceptor (tampón de activación/tampón de reacción/perlas aceptoras); transferir 4 µl de lisado de placas de 96 pocillos a Proxiplates de 384 pocillos; añadir 5 µl de mezcla de aceptor a placas proxiplate(s) de 384 y sellar las placas con un sello de aluminio; agitar 1-2 minutos en un agitador de placas; incubar la placa a temperatura ambiente durante 2 h con agitación suave; hacer una mezcla de donadores (perlas de donadores en tampón de dilución); añadir 2 µl de mezcla de donador a las placas de ensayo; sellar las placas con sello de aluminio; agitar 1-2 minutos en un agitador de placas; incubar a temperatura ambiente durante 2 h con agitación suave; leer la placa con Envision; protocolo AlphaScreen Surefire 384.

25

30

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 6 se ensayaron y mostraron la siguiente actividad como se ilustra en la Tabla 4 a continuación.

35

Tabla 4

N.º de ejemplo	CI ₅₀ (nM)
1	0,154±0,023 (n=2)
2	0,275±0,102 (n=3)
6	0,168±0,090 (n=4)

Los datos de la Tabla 4 demuestran que los compuestos de los Ejemplos 1, 2 y 6 inhiben la enzima JAK1 en un ensayo basado en células proporcionan apoyo de que los compuestos de los Ejemplos también inhiben la enzima JAK1 en la célula.

40

Ensayos de sangre humana completa: Determinación de pSTAT3 (JAK1) y pSTAT5 (JAK2) en linfocitos y monocitos

Se desarrollaron y validaron ensayos de sangre completa humana (HWB, por sus siglas en inglés) para determinar la selectividad JAK1 y JAK2 de los compuestos de prueba.

45

Diluir los compuestos de prueba, 10 puntos, (1:3) en DMSO al 100% y una etapa de reducción en PBS + BSA al 0,1 %. Utilizar tofacitinib como compuesto de referencia en cada placa, así como una señal máxima (pocillos estimulados) y una señal mínima (pocillos no estimulados) para normalizar los datos. Obtenga un grupo de HWB de 4 donantes sanos diferentes. Coloque la sangre en una placa de 96 pocillos usando un Tecan Evo 96w e incubar con los compuestos de prueba durante 1 hora a TA. Después de este tiempo de incubación, estimular HWB con IL6 (206-IL, R&D System) y GM-CSF (PHC2015, Life Technologies) durante 15 minutos más. Agregar un colorante de viabilidad (65-0865, eBioscience) (1:1000) usando un Tecan Evo 96w (5xmix).

50

Las concentraciones finales en el ensayo son las siguientes: 100 µM para compuestos, 50 µM para tofacitinib, 0,1

µg/ml de IL6, 0,038 µg/ml de GM-CSF y DMSO al 1%. Lisar y fijar HWB usando un tampón de Lisis/fijación (558049, Becton Dickinson) agregando 900 µl de tampón de lisis usando Tecan Evo 96w (mezcla 10x de alta velocidad). Incubar HWB en baño a 37 °C durante 10 minutos. Centrifugar la HWB a 500G, 8 min y desechar el sobrenadante. Agregar MeOH frío usando un Tecan Exo 96w para permeabilizar las células. Incubar las células sanguíneas en hielo durante 30 min. Después de esto, lavar las células 2 veces con tampón de tinción (554656, Becton Dickinson), centrifugar a 3000 rpm, 2 min, descartar el sobrenadante y agregar los siguientes anticuerpos: Anti-CD4 humano PE, a 1:100 (12-0048, eBioscience), Anti-CD33 humano eFluor® 450, a 1:50 (48-0337, eBioscience), mAb de conejo Phospho-STAT5 (Tyr694) (C71E5), 1:100 (conjugado con Alexa Fluor® 488)(3939, Cell Signaling) y mAb de conejo Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP™ a 1:200, (Conjugado con Alexa Fluor® 647)(4324, Cell Signaling). Incubar los anticuerpos durante 1 h en oscuridad a temperatura ambiente, luego lavar las células 2 veces y leer en el citómetro Macsquant (Miltenyi Biotec). Clasificar los datos de CD4+ (linfocitos) y CD4Low CD33Hi (monocitos), para medir la intensidad de la fluorescencia de las células que expresan pSTAT3 y pSTAT5, respectivamente. Analizar los datos utilizando FlowJo v 10 y luego normalizar la mediana de fluorescencia frente a la señal máxima y mínima para determinar los ICsos. Utilizar Graph Pad Prism 5™ para representar las curvas de respuesta a la dosis.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, se ensayaron los compuestos de los Ejemplos en el presente documento. Los compuestos de los ejemplos presentaron una mayor selectividad para JAK1 sobre JAK 2, La actividad de los compuestos de los Ejemplos 6 a 10 se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5

N.º de ejemplo	JAK1 CI ₅₀ (µM)	JAK2 CI ₅₀ (µM)
6	3,65±0,79 (n=7)	20,3±6,3(n=6)
7	4,17±1,87 (n=6)	18,6±6,1(n=5)
8	3,13±1,1(n=6)	9,63±2,52(n=6)
9	4,53±2,09(n=7)	16,9±4,5(n=6)
10	1,29±0,64 (n=3)	6,86±2,13(n=3)

Los datos de la Tabla 5 demuestran que los compuestos de los Ejemplos son más potentes para JAK1 que para JAK2 en un ensayo de sangre completa humana.

Ensayo PK/PD en ratas

Las ratas Wistar macho, de 265-285 gramos (Charles River) se usaron para la dosificación oral por sonda. Dar dosis a los animales (sonda oral) de 1,82 ml/kg (0,5 ml por 275 gramos). Formular los compuestos en un vehículo de HEC al 1 % que contenga Tween 80 al 0,25 % y antiespumante al 0,05 % con 1,1 equivalentes molares de ácido metanosulfónico para formar una sal in situ. Formular los compuestos una vez por semana y almacenarlos a 4 °C. En varios momentos, obtener sangre completa de rata a través del sangrado de la vena de la cola en tubos de recolección de sangre con EDTA de 600 µl Multivette (n.º de cat 151671100PK100, Sarstedt Inc) y utilizar para el ensayo *ex vivo* de JAK1 y JAK2. Colocar alícuotas de 100 µl de sangre de cada rata en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Estimular la sangre completa mediante IL-6 recombinante (100 ng/ml) y GM-CSF de ratón recombinante (n.º de cat 415-ML, n.º de lote, R&D) durante 12 min a ta. Después de la estimulación con citocinas, agregar sangre completa en Lyse/fix (n.º de cat 558049, n.º de lote, BD) en rejilla de minitubos; mezclar bien 5 veces. Incubar 10 min a ta. Centrifugar la rejilla para minitubos a 600 g durante 4 min. Aspirar con colector de 12 canales. Transferir el contenido de la rejilla de minitubos a placas de fondo redondo de 96 pocillos. Centrifugar las células a 3000 rpm durante 1 minuto y desechar el sobrenadante. Mezclar las células en el pocillo con 100 µl de MeOH helado e incubar en hielo durante 30 min. Agregar 150 µl de PBS + FCS al 2 % en cada pocillo y centrifugar a 3000 rpm, 2 minutos. Lavar las células con 2x de 250 µl de PBS + FCS al 2 %. Para tinción intracelular y de la superficie celular, mezclar todos los anticuerpos y agregar en cada pocillo e incubar 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Los anticuerpos utilizados para la tinción son los siguientes: pSTAT3, Alexa Fluor 647 (n.º de cat. 4324s, lote, Cell Signaling); pSTAT5, Alexa Fluor 488 (n.º de cat. 3939s, n.º de lote, Cell Signaling), anti-CD4 de rata, V450 (n.º de cat. 561579, n.º de lote, BD); anti-CD11b de rata, Percp eFluor710 (n.º de cat. 12-0110-82, n.º de lote, eBioscience). Después de teñir las células con Abs, lavar las placas dos veces con PBS + FCS al 2 % y finalmente resuspender en los mismos 150 µl de solución. Evaluar la viabilidad celular mediante Viability Dye 780 (n.º de cat. 65-0865-14, n.º de lote, eBioscience). Realizar el ensayo de citometría usando FORTRESSA.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se describe anteriormente, se ensayaron los compuestos de los Ejemplos 4 y 6 a 10 y los datos se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6

Actividad <i>ex vivo</i> de JAK1 y JAK2 en sangre completa de rata (% de inhibición a 30 mpk en comparación con el tratamiento con vehículo como 100 % de inhibición)				
N.º de ejemplo	Inhibición de JAK1 2 h después de la dosificación (%)	Inhibición de JAK2 2 h después de la dosificación (%)	Inhibición de JAK1 7 h después de la dosificación (%)	Inhibición de JAK2 7 h después de la dosificación (%)
4	72,0	22,9	22,3	20,1
6	83,5	17,7	75,4	17,4
7	70,7	10,7	61,0	3,40

Estos datos apoyan la actividad de los compuestos de los ejemplos y que son más potentes para JAK1 que para JAK2 en ratas *in vivo*.

5

Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas

Este protocolo utiliza ratas Lewis (peso 150-175 gramos) de Charles River. El día 0, anestesiarse ratas con isoflurano. El día 1, inmunizar por vía intradérmica con emulsión de colágeno en dos sitios en la región lumbar inferior, por encima de la base de la cola. El volumen de dosis es un mínimo de 0,4 ml por lugar de inyección. El día 8, anestesiarse ratas con isoflurano e inmunizar intradérmicamente con emulsión de colágeno en dos sitios de la región lumbar inferior, por encima de la base de la cola. Inscribir ratas en grupos de tratamiento el día 12, basándose en la inflamación (enrojecimiento y/o hinchazón) en sus patas traseras. Aleatorizar a los animales para la fase de tratamiento según los valores de medición del tobillo y el peso corporal mediante la herramienta de asignación de bloques al azar. Registrar la hinchazón del tobillo los días 1, 8 y 11 y luego tres veces por semana después de la inscripción hasta el día de la necropsia inclusive. Dar dosis de los compuestos por vía oral una vez al día a partir del día 12 (después de la aleatorización) hasta el día 25. Los compuestos de los Ejemplos 6 y 7 se evaluaron en el protocolo esencialmente como se describió anteriormente. Los resultados se enumeran en la Tabla 7 a continuación.

20

Tabla 7

Inhibición de la hinchazón de la pata de rata (% de inhibición en comparación con ratas sin tratamiento previo como 100 % de inhibición)			
N.º de ejemplo	% de inhibición a 30 mpk	% de inhibición a 10 mpk	% de inhibición a 3 mpk
6	79	47	12
7	73	69	0

Los datos de la Tabla 7 demuestran que los compuestos de los Ejemplos 6 y 7 presentan una inhibición sensible a la dosis de la hinchazón de las patas en ratas, y respaldan que los compuestos de los Ejemplos pueden ser eficaces en el tratamiento de la artritis.

25

Modelo de artritis inducida por adyuvantes (AIA) en ratas

Los efectos de los compuestos sobre la inflamación de la poliartritis y la erosión ósea de la articulación del tobillo se pueden evaluar en un modelo de artritis inducida por adyuvantes (AIA) en ratas. Utilizar ratas Lewis macho con un peso corporal medio de 185 g para el estudio. Inducir la artritis mediante inyección intradérmica localizada en la base de la cola con 100 µl de aceite de emulsión de inmunización en suspensión de adyuvante. Aleatorizar a los animales según el grosor medio de la pata y el peso corporal el día 10 en grupos de estudio con 8 ratas en cada grupo. Preparar compuestos en HEC al 1 % / P80 al 0,25 %/AF al 0,05 % AF en agua purificada y dar dosis diariamente por sonda oral comenzando desde el día 11 después de la inmunización durante 14 días. Cuantificar el grosor de la pata con la medida del calibre en ambos tobillos. Evaluar las diferencias de grupo utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples con controles de vehículo. El compuesto del Ejemplo 10 se evalúa en el protocolo esencialmente como se describió anteriormente. Los resultados se enumeran en la Tabla 8 a continuación.

40

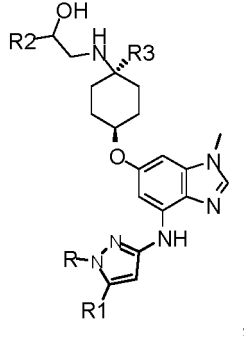
Tabla 8

Inhibición de la pérdida de hinchazón de la pata y densidad mineral ósea (DMO) (% de inhibición en comparación con ratas sin tratamiento previo como inhibición del 100 %) en el modelo de AIA de rata		
Dosis de ejemplo n.º 10	% de inhibición de la hinchazón de las patas	% de inhibición de la pérdida de DMO en la pata
3mpk	26	39
10mpk	63	81
30mpk	73	84

Los datos de la Tabla 8 demuestran que el compuesto del Ejemplo 10 presenta una inhibición de la hinchazón de las patas en ratas, sensible a la dosis, y respaldan que el compuesto del Ejemplo puede ser eficaz en el tratamiento de la artritis.

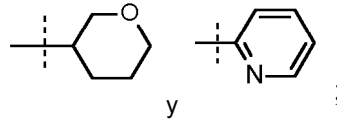
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



5

en donde R se selecciona entre: H, -alquilo C₁₋₃, -CH₂CH(OH)CH₃, -alquil C₂₋₃-O-CH₃,



10

R1 se selecciona entre: H, -CH₃ y -OCH₃;

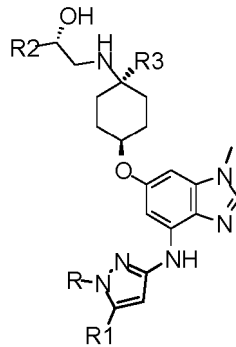
R2 es -CHF₂ o -CF₃; y

R3 es H o -CH₃;

con la condición de que cuando R2 es -CF₃ y R3 es H, o R o R1 puede ser -CH₃, pero no ambos.

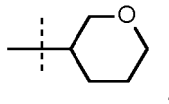
15

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 de la fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



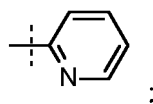
20 en donde:

R se selecciona entre: H, -alquilo C₁₋₃, -CH₂CH(OH)CH₃, -alquil C₂₋₃-O-CH₃,



25

y



R1 se selecciona entre: H, -CH₃ y -OCH₃;

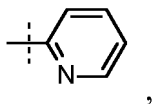
R2 es -CHF₂ o -CF₃; y

R3 es H o -CH₃;

con la condición de que cuando R2 es -CF₃ y R3 es H, o R o R1 puede ser -CH₃, pero no ambos.

5

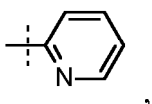
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en donde R se selecciona entre: -CH₃, -CH₂CH₃ y



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde R es -CH₃ o -CH₂CH₃ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde R es



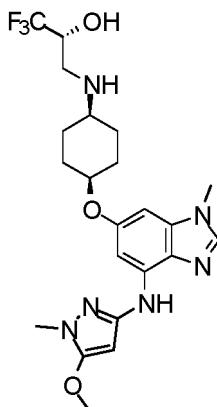
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde R2 es -CF₃ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde R3 es -CH₃ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

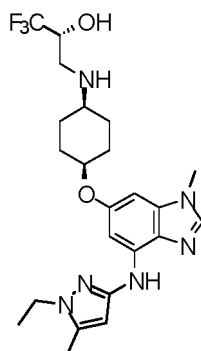
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es



30

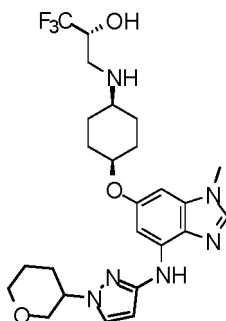
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

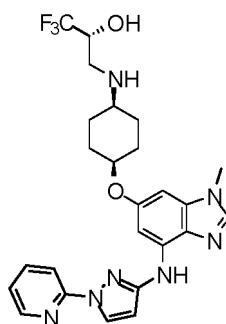
- 5 10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 que es



- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 que es 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((*cis*-4-((1-metil-4-((1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato.

20

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 que es (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((*cis*-4-((1-metil-4-((1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol en forma cristalina **caracterizado por** un patrón de rayos X en polvo obtenido a partir de una fuente de CuK α ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$), que tiene un máximo en 20,5 junto con uno o más máximos seleccionados entre el grupo que consiste en 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 22,9 y 23,6; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

25

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 que es 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-((*cis*-4-((1-metil-4-((1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il)amino)-1H-benzimidazol-6-il)oxi)ciclohexil)amino)propan-2-ol hidrato en forma cristalina **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido a partir de una fuente de CuK α ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$), que tiene un máximo a 17,9 junto con uno o más máximos

30

seleccionados entre el grupo que consiste en 26,1, 26,6 y 22,7; con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

5 15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 que comprende más del 80 % p/p de un compuesto que es 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-({*cis*-4-[(1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol hidrato en forma cristalina.

17. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15 que comprende más del 90 % p/p de un compuesto que es 2-hidroxiopropan-1,2,3-tricarboxilato de (2R)-1,1,1-trifluoro-3-({*cis*-4-[(1-metil-4-[[1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-3-il]amino]-1H-benzoimidazol-6-il]oxi]ciclohexil]amino)propan-2-ol hidrato en forma cristalina.

15 18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en terapia.

19. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de artritis.