

SIB EX4945R

P069695SM:JAW/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 17158350.3, pubblicazione n° 3231801

a nome di Incyte Corporation

di 1801 Augustine Cut-Off , Wilmington, Delaware 19803, U.S.A.

“SALE DI BIPIRAZOLO COME INIBITORE DI JAK”

Jacopo de Benedetti
USBM-043R B

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

La presente invenzione fornisce un sale di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide che è utile nel trattamento di malattie correlate all'attività di JAK inclusi, ad esempio, disturbi infiammatori, disturbi autoimmuni, cancro, e altre malattie.

SFONDO

Le protein chinasi (PK) regolano diversi processi biologici inclusi la crescita, sopravvivenza e differenziazione cellulare, formazione di organi, morfogenesi, neovascolarizzazione, riparazione e rigenerazione tissutale, tra le altre cose. Le protein chinasi svolgono anche ruoli specializzati in una molteplicità di malattie umane incluso il cancro. Le citochine, polipeptidi o glicoproteine a basso peso molecolare, regolano molte vie coinvolte nella risposta infiammatoria dell'ospite alla sepsi. Le citochine influenzano la differenziazione, la proliferazione e l'attivazione cellulare e possono modulare sia le risposte pro-infiammatorie che anti-infiammatorie per consentire all'ospite di reagire adeguatamente ai patogeni. La segnalazione di un'ampia gamma di citochine coinvolge la famiglia delle Janus chinasi (JAK) delle proteine tirosin chinasi e i trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione (STAT). Vi sono quattro JAK di mammifero note: JAK1 (Janus kinasi-1), JAK2, JAK3 (note anche come Janus kinasi, leucocita; JAKL; e L-JAK) e TYK2 (proteina-tirosin chinasi 2).

Le risposte immunitarie infiammatorie stimulate da citochine contribuiscono alla patogenesi di malattie: patologie quali immunodeficienza combinata grave (SCID) derivano dalla soppressione del sistema immunitario, mentre una risposta immunitaria/infiammatoria iperattiva o inadeguata contribuisce alla patologia di malattie autoimmuni (*ad es.*, asma, lupus eritematoso sistemico, tiroidite, miocardite), e malattie quali scleroderma e osteoartrite (Ortmann, R. A., T. Cheng, *et al.* (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32).

Deficienze nell'espressione di JAK sono associate a molti stati patologici. Ad esempio, topi *Jak1*^{-/-} sono più piccoli alla nascita, non riescono a nutrirsi e muoiono perinatalmente (Rodig, S.J., M.A. Meraz, *et al.* (1998) *Cell* 93(3): 373-83). Embrioni di topo *Jak2*^{-/-} sono anemici e muoiono intorno al giorno 12.5 post-coito a causa dell'assenza di eritropoiesi definitiva.

La via JAK/STAT, ed in particolare tutte le quattro JAK si ritiene svolgano un ruolo nella patogenesi della risposta asmatica, della malattia polmonare ostruttiva cronica, bronchite e di altre malattie infiammatorie associate del tratto respiratorio inferiore. Molteplici citochine che segnalano attraverso JAK sono state associate a malattie/condizioni infiammatorie del tratto respiratorio superiore, quali quelle che colpiscono il naso e i seni (*ad es.*, rinite e sinusite) sia come reazioni classicamente allergiche o meno. La via JAK/STAT è anche stata coinvolta in malattie/condizioni infiammatorie dell'occhio e risposte allergiche croniche.

L'attivazione di JAK/STAT nel cancro può avvenire mediante stimolazione citochinica (*ad es.*, IL-6 o GM-CSF) o mediante una riduzione dei soppressori endogeni della segnalazione di JAK quali SOCS (soppressore o segnalazione citochinica) o PIAS (inibitore proteico di STAT attivati) (Boudny, V., e Kovarik, J., *Neoplasms*. 49:349-355, 2002). L'attivazione della segnalazione di STAT, nonché altre vie a valle di JAK (*ad es.*, Akt), sono state correlate ad una scarsa prognosi in molti tipi di cancro (Bowman T., *et al. Oncogene* 19:2474-2488, 2000). Livelli elevati di citochine in circolazione che segnalano attraverso JAK/STAT svolgono un ruolo causativo nella cachessia e/o fatica cronica. Pertanto, l'inibizione di JAK può essere vantaggiosa per pazienti affetti da cancro per motivi che vanno oltre l'attività anti-tumorale potenziale.

La tirosin chinasi JAK2 può essere vantaggiosa per pazienti con disturbi mieloproliferativi, *ad es.*, policitemia vera (PV), trombocitemia essenziale (ET), metaplasia mieloide con mielofibrosi (MMM) (Levin, *et al., Cancer Cell*, vol. 7, 2005: 387-397). L'inibizione della JAK2V617F chinasi diminuisce la proliferazione di cellule ematopoietiche, indicando JAK2 come potenziale target per l'inibizione farmacologica in pazienti con PV, ET, e MMM.

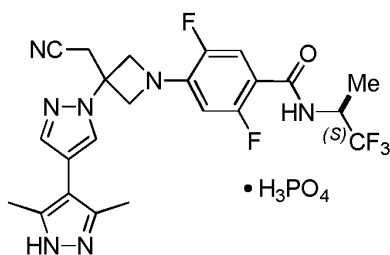
L'inibizione delle JAK può fornire beneficio a pazienti che soffrono di disturbi immunitari della pelle quali psoriasi e sensibilizzazione cutanea. Il perdurare della psoriasi è considerato dipendere da una serie di citochine infiammatorie oltre a varie chemochine e a fattori di crescita (JCI, 113: 1664-1675), molti dei quali segnalano attraverso le JAK (*Adv Pharmacol.* 2000; 47: 113-74).

Pertanto, agenti nuovi o migliorati che inibiscono le chinasi quali JAK sono ancora necessari per sviluppare nuovi e più efficaci prodotti farmaceutici che sono indirizzati ad aumentare o a sopprimere le vie immunitarie e

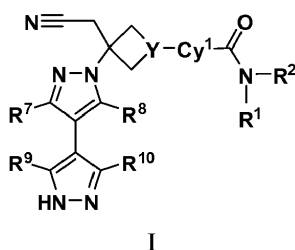
infiammatorie (quali agenti immunosoppressivi per trapianti di organi), nonché agenti per la prevenzione e il trattamento di malattie autoimmuni, malattie che implicano una risposta infiammatoria iperattiva (*ad es.*, eczema), allergie, cancro (*ad es.*, prostata, leucemia, mieloma multiplo), e alcune reazioni immunitarie (*ad es.*, eruzioni cutanee o dermatite da contatto o diarrea) causate da altri agenti terapeutici. Il sale dell'invenzione e i composti descritti qui, nonché le sue composizioni e i metodi descritti nella presente sono diretti verso tali necessità e altri obiettivi.

SOMMARIO

La presente invenzione fornisce *inter alia*, un sale che è 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosfato (Composto I fosfato) avente la formula:



Descritti qui sono, *inter alia*, composti di Formula I:



e loro sali farmaceuticamente accettabili, in cui Y, Cy¹, R¹, R², R⁷, R⁸, R⁹ e R¹⁰ sono definiti *infra*.

Descritte sono anche composizioni comprendenti un composto di Formula I, o un loro sale farmaceuticamente accettabile, e un veicolante farmaceuticamente accettabile.

Descritti sono anche metodi per modulare un'attività di JAK1 comprendenti porre a contatto JAK1 con un composto di Formula I, o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Descritti sono anche metodi per trattare una malattia o un disturbo associato con una espressione o attività anomala di chinasi in un paziente mediante somministrazione a un paziente di una quantità terapeuticamente efficace di un composto di Formula I, o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Descritti sono anche metodi di trattamento di una malattia autoimmune, un cancro, un disturbo mieloproliferativo, una sindrome mielodisplastica (MDS), una malattia infiammatoria, una malattia di riassorbimento osseo, o rigetto del trapianto di organo in un paziente che ne ha necessità, comprendente la somministrazione a detto paziente di una quantità terapeuticamente efficace di un composto di Formula I, oppure di un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Descritti sono anche composti di Formula I, o loro Sali farmaceuticamente accettabili, come descritti qui per l'uso nel trattamento di malattie autoimmuni, cancro, malattie mieloproliferative, sindromi mielodisplastiche (MDS), malattie infiammatorie, una malattia di riassorbimento osseo, o rigetto di trapianto d'organo.

Descritti sono anche composti di Formula I come descritti nella presente, o loro sali farmaceuticamente accettabili, per l'uso nella modulazione di JAK1.

Descritti sono anche usi di composti di Formula I come descritto nella presente, o loro sali farmaceuticamente accettabili per la preparazione di farmaci per l'uso in metodi di modulazione di JAK1.

DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La Figura 1 mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 14.

La Figura 2 mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 15.

La Figura 3 mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 16.

La Figura 4A mostra un termogramma DSC caratteristico del sale dell'Esempio 17.

La Figura 4B mostra dati TGA caratteristici del sale dell'Esempio 17.

La Figura 4C mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 17.

La Figura 5A mostra un termogramma DSC caratteristico del sale dell'Esempio 18.

La Figura 5B mostra dati TGA caratteristici del sale dell'Esempio 18.

La Figura 5C mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 18.

La Figura 6 mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 19.

La Figura 7A mostra un termogramma DSC caratteristico del sale dell'Esempio 20.

La Figura 7B mostra dati TGA caratteristici del sale dell'Esempio 20.

La Figura 7C mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 20.

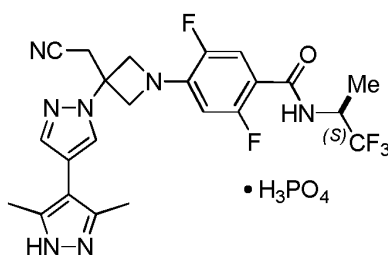
La Figura 8A mostra un termogramma DSC caratteristico del sale dell'Esempio 21.

La Figura 8B mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 21.

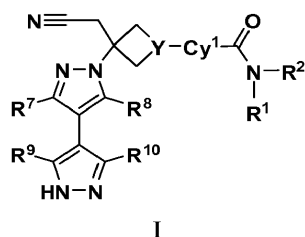
La Figura 9 mostra un pattern XRPD caratteristico del sale dell'Esempio 22.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

La presente invenzione fornisce *inter alia*, un sale che è 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosfato (Composto I fosfato) avente la formula:



Descritto qui è, *inter alia*, un composto di Formula I:



o suoi sali farmaceuticamente accettabili; in cui:

Cy¹ è fenile, piridile, pirimidinile, pirazinile, o piridazinile, ognuno dei quali è opzionalmente sostituito da 1, 2, 3 o 4 gruppi indipendentemente selezionati tra R³, R⁴, R⁵ e R⁶;

Y è N o CH;

R¹ è C₁₋₆ alchile, C₁₋₆ aloalchile, C₃₋₇ cicloalchile, C₃₋₇ cicloalchile-C₁₋₃ alchile, eterocicloalchile a 4-7 membri,

eterocicloalchile a 4-7 membri-C₁₋₃ alchile, fenile, fenile-C₁₋₃ alchile, eteroarile a 5-6 membri o eteroarile a 5-6 membri-C₁₋₃ alchile, ognuno dei quali è opzionalmente sostituito con 1, 2, o 3 sostituenti indipendentemente selezionati tra fluoro, cloro, C₁₋₃ alchile, -OH, -O(C₁₋₃ alchile), -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(C₁₋₃ alchile), -N(C₁₋₃ alchile)₂, -C(=O)N(C₁₋₃ alchile)₂, -C(=O)NH(C₁₋₃ alchile), -C(=O)NH₂, -C(=O)O(C₁₋₃ alchile), -S(=O)₂(C₁₋₃ alchile), -S(=O)₂(C₃₋₆ cicloalchile), -C(=O)(C₃₋₆ cicloalchile), e -C(=O)(C₁₋₃ alchile);

R² è H o C₁₋₃ alchile; in cui detto C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito da 1, 2, o 3 sostituenti indipendentemente selezionati tra fluoro, cloro, -OH, -O(C₁₋₃ alchile), -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, NH₂, -NH(C₁₋₃ alchile), e -N(C₁₋₃ alchile)₂; o

R¹ e R², unitamente all'atomo di azoto a cui sono attaccati, formano un anello eterocicloalchile a 4, 5 o 6 membri che è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 sostituenti indipendentemente selezionati tra F, Cl, -OH, -O(C₁₋₃ alchile), -CN, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ aloalchile, -NH₂, -NH(C₁₋₃ alchile), -N(C₁₋₃ alchile)₂, -CH₂CN, e -CH₂OH;

R³ è H, F, Cl, -CN, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ fluoroalchile, -O(C₁₋₃ alchile), o -O(C₁₋₃ fluoroalchile);

R⁴ è H, F, Cl, -CN, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ fluoroalchile, -O(C₁₋₃ alchile), o -OC(C₁₋₃ fluoroalchile);

R⁵ è H, F, Cl, -CN, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ fluoroalchile, -O(C₁₋₃ alchile), o -OC(C₁₋₃ fluoroalchile);

R⁶ è H, F, Cl, -CN, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ fluoroalchile, -O(C₁₋₃ alchile), o -OC(C₁₋₃ fluoroalchile);

R⁷ è H, F, Cl, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ aloalchile, -NR^{17a}R^{17a}, -NHC(=O)R^{17b}, -C(=O)NR^{17a}R^{17b}, -NHS(=O)₂R^{17b}, o -S(=O)₂NR^{17a}R^{17b}, in cui detto C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 sostituenti selezionati tra F, Cl, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, OH, -OCH₃ e -OCF₃, -OCHF₂ e -OCH₂F;

R⁸ è H, F, Cl, C₁₋₃ alchile, o C₁₋₃ aloalchile;

R⁹ è H, F, Cl, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ aloalchile, ciclopropile, -CN, -NH₂, -NH(C₁₋₃ alchile), o -N(C₁₋₃ alchile)₂, in cui detto C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2, o 3 sostituenti selezionati tra F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂ e OH;

R¹⁰ è H, F, Cl, C₁₋₃ alchile, C₁₋₃ aloalchile, ciclopropile, -CN, -NH₂, -NH(C₁₋₃ alchile), o -N(C₁₋₃ alchile)₂, in cui detto C₁₋₃ alchile è opzionalmente sostituito con 1, 2, o 3 sostituenti selezionati tra F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, e OH;

R¹⁷ è C₁₋₆ alchile, fenile o eteroarile a 5-6 membri, ognuno dei quali è opzionalmente sostituito con 1, 2, 3 o 4 sostituenti R²⁷ indipendentemente selezionati;

R^{17a} è H o C₁₋₃ alchile;

R^{17b} è C₁₋₃ alchile opzionalmente sostituito con 1, 2 o 3 sostituenti selezionati tra F, cloro, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -NH(CH₃), -N(CH₃)₂, OH, -OCH₃ e -OCF₃, -OCHF₂ e -OCH₂F; e

ogni R²⁷ è indipendentemente selezionato tra alogeno, -OH, NO₂, -CN, C₁₋₃ alchile, C₂₋₃ alchenile, C₂₋₃ alchinile, C₁₋₃ aloalchile, ciano-C₁₋₃ alchile, HO-C₁₋₃ alchile, CF₃-C₁₋₃ idrossialchile, C₁₋₃ alcossi-C₁₋₃ alchile, C₃₋₇ cicloalchile, C₁₋₃ alcossi, C₁₋₃ aloalcossi, H₂N-, (C₁₋₃ alchile)NH-, (C₁₋₃ alchile)₂N-, HS-, C₁₋₃ alchil-S-, C₁₋₃ alchil-S(=O)-, C₁₋₃ alchil-S(=O)₂-, carbammile, C₁₋₃ alchilcarbammile, di(C₁₋₃ alchil)carbammile, carbossi, C₁₋₃ alchil-C(=O)-, C₁₋₄ alcossi-C(=O)-, C₁₋₃ alchil-C(=O)O-, C₁₋₃ alchil-C(=O)NH-, C₁₋₃ alchil-S(=O)₂NH-, H₂N-SO₂-, C₁₋₃ alchil-NH-S(=O)₂-, (C₁₋₃ alchile)₂N-S(=O)₂-, H₂N-S(=O)₂NH-, C₁₋₃ alchil-NHS(=O)₂NH-, (C₁₋₃ alchile)₂N-S(=O)₂NH-, H₂N-C(=O)NH-, C₁₋₃ alchil-NHC(=O)NH-, e (C₁₋₃ alchile)₂N-C(=O)NH-

Descritto qui è anche 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide, o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

In alcune forme di realizzazione, la presente domanda fornisce un sale scelto tra:

sale dell'acido fosforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide;

sale dell'acido cloridrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide;

sale dell'acido bromidrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide; e

sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide.

In alcune forme di realizzazione, il sale è sale dell'acido fosforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di

realizzazione, il sale è un rapporto stechiometrico di 1:1 tra 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide e acido fosforico. In alcune forme di realizzazione, il sale è cristallino. In alcune forme di realizzazione, il sale è sostanzialmente isolato.

Descritto qui è anche il sale dell'acido cloridrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, il sale è un rapporto stechiometrico di 1:1 tra 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide e acido cloridrico. In alcune forme di realizzazione, il sale è cristallino. In alcune forme di realizzazione, il sale è sostanzialmente isolato.

Descritto qui è anche il sale dell'acido bromidrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, il sale è un rapporto stechiometrico di 1:1 tra 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide e acido bromidrico. In alcune forme di realizzazione, il sale è cristallino. In alcune forme di realizzazione, il sale è sostanzialmente isolato.

Descritto qui è anche il sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, il sale è un rapporto stechiometrico di 1:1 tra 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide e acido solforico. In alcune forme di realizzazione, il sale è cristallino. In alcune forme di realizzazione, il sale è sostanzialmente isolato.

In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide è caratterizzato da un termogramma DSC avente un picco endotermico a circa 228°C. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico ha un termogramma DSC sostanzialmente come mostrato in Figura 4A. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico ha almeno un picco XRPD, in termini di 2 teta, selezionato tra circa 6,8°, circa 16,5°, circa 19,8°, circa 20,7° e circa 23,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido

fosforico ha almeno due picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 6,8°, circa 16,5°, circa 19,8°, circa 20,7°, e circa 23,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico ha almeno tre picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 6,8°, circa 16,5°, circa 19,8°, circa 20,7°, e circa 23,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico ha almeno quattro picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 6,8°, circa 16,5°, circa 19,8°, circa 20,7° e circa 23,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido fosforico ha un profilo XRPD sostanzialmente come mostrato in Figura 4C.

In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide è caratterizzato da un termogramma DSC avente un picco endotermico a circa 213°C. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha un termogramma DSC sostanzialmente come mostrato in Figura 5A. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha almeno un picco XRPD, in termini di 2 teta, selezionato tra circa 7,0°, circa 12,1°, circa 13,7°, circa 14,8°, circa 15,5°, circa 16,6°, circa 17,1°, circa 19,7°, circa 20,4°, circa 20,8°, circa 23,9°, circa 24,7°, circa 25,1°, circa 25,7°, circa 27,4° e circa 28,3°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha almeno due picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 12,1°, circa 13,7°, circa 14,8°, circa 15,5°, circa 16,6°, circa 17,1°, circa 19,7°, circa 20,4°, circa 20,8°, circa 23,9°, circa 24,7°, circa 25,1°, circa 25,7°, circa 27,4° e circa 28,3°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha almeno tre picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 12,1°, circa 13,7°, circa 14,8°, circa 15,5°, circa 16,6°, circa 17,1°, circa 19,7°, circa 20,4°, circa 20,8°, circa 23,9°, circa 24,7°, circa 25,1°, circa 25,7°, circa 27,4° e circa 28,3°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha almeno quattro picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 12,1°, circa 13,7°, circa 14,8°, circa 15,5°, circa 16,6°, circa 17,1°, circa 19,7°, circa 20,4°, circa 20,8°, circa 23,9°, circa 24,7°, circa 25,1°, circa 25,7°, circa 27,4° e circa 28,3°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido cloridrico ha un profilo XRPD sostanzialmente come mostrato in Figura 5C.

In alcune forme di realizzazione, il sale bromidrico dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide è caratterizzato da un

termogramma DSC avente un picco endotermico a circa 203°C. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha un termogramma DSC sostanzialmente come mostrato in Figura 7A. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha almeno un picco XRPD, in termini di 2 teta, selezionato tra circa 7,0°, circa 14,4°, circa 17,1°, circa 20,2°, circa 21,1°, circa 22,8°, circa 23,5°, circa 24,9°, circa 26,6°, circa 27,1°, e circa 28,2°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha almeno due picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 14,4°, circa 17,1°, circa 20,2°, circa 21,1°, circa 22,8°, circa 23,5°, circa 24,9°, circa 26,6°, circa 27,1°, e circa 28,2°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha almeno tre picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 14,4°, circa 17,1°, circa 20,2°, circa 21,1°, circa 22,8°, circa 23,5°, circa 24,9°, circa 26,6°, circa 27,1°, e circa 28,2°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha almeno quattro picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,0°, circa 14,4°, circa 17,1°, circa 20,2°, circa 21,1°, circa 22,8°, circa 23,5°, circa 24,9°, circa 26,6°, circa 27,1°, e circa 28,2°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido bromidrico ha un profilo XRPD sostanzialmente come mostrato in Figura 7C.

In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide è caratterizzato da un termogramma DSC avente un picco endotermico a circa 259°C. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico è caratterizzato da un termogramma DSC avente tre picchi endotermici a circa 136°C, circa 147°C e circa 259°C. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha un termogramma DSC sostanzialmente come mostrato in Figura 8A. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha almeno un picco XRPD, in termini di 2 teta, selezionato tra circa 7,3°, circa 14,7°, circa 9,9°, circa 19,0°, circa 19,6°, circa 21,3°, e circa 24,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha almeno due picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,3°, circa 14,7°, circa 9,9°, circa 19,0°, circa 19,6°, circa 21,3°, e circa 24,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha almeno tre picchi XRPD, in termini di 2 teta, selezionati tra circa 7,3°, circa 14,7°, circa 9,9°, circa 19,0°, circa 19,6°, circa 21,3°, e circa 24,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha almeno quattro picchi XRPD, in termini di

2-teta, selezionati tra circa 7,3°, circa 14,7°, circa 9,9°, circa 19,0°, circa 19,6°, circa 21,3°, e circa 24,6°. In alcune forme di realizzazione, il sale dell'acido solforico ha un profilo XRPD sostanzialmente come mostrato in Figura 8B.

Diverse forme cristalline possono avere diversi reticoli cristallini (ad es., celle unitarie) e, solitamente, di conseguenza, avere diverse proprietà fisiche. Le diverse forme di sale possono essere identificate mediante metodi di caratterizzazione dello stato solido, quali mediante diffrazione delle polveri a raggi X (XRPD). Altri metodi di caratterizzazione come calorimetria a scansione differenziale (DSC), analisi termogravimetrica (TGA), assorbimento di vapore dinamico (DVS), e simili aiutano ulteriormente ad identificare la forma nonché aiutano anche a determinare la stabilità e il contenuto di solvente/acqua.

Un pattern XRPD di riflessi (picchi) è tipicamente considerato un'impronta di una particolare forma cristallina. E' ben noto che le relative intensità dei picchi XRPD possono variare ampiamente a seconda, *inter alia*, della tecnica di preparazione del campione, la distribuzione granulometrica dei cristalli, i vari filtri usati, la procedura di montaggio del campione e il particolare strumento impiegato. In alcuni casi, è possibile osservare nuovi picchi o picchi esistenti possono scomparire, a seconda del tipo di strumento o delle impostazioni. Come usato nella presente, il termine "picco" si riferisce ad un riflesso avente una altezza/intensità relativa di almeno circa il 4% dell'altezza/intensità del picco massimo. Inoltre, la variazione degli strumenti e altri fattori può influire sui valori 2-teta. Pertanto, le assegnazioni dei picchi, quali quelle riportate nella presente, possono variare di più o meno circa 0,2° (2-teta), e il termine "sostanzialmente" e "circa" come usato nel contesto della XRPD nella presente intende comprendere le variazioni sopra citate.

Allo stesso modo, le letture della temperatura in relazione a DSC, TGA o altri esperimenti termici possono variare di circa $\pm 3^{\circ}\text{C}$ a seconda dello strumento, delle particolari impostazioni, della preparazione del campione ecc. Di conseguenza, una forma cristallina riportata nella presente avente un termogramma DSC "sostanzialmente" come mostrato in una qualsiasi delle Figure o il termine "circa" è inteso comprendere tale variazione.

In alcune forme di realizzazione, i sali descritti nella presente sono sostanzialmente isolati. Con "sostanzialmente

isolati" si intende che il composto è almeno parzialmente o sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rivelato. La separazione parziale può includere, ad esempio, una composizione arricchita dei sali descritti nella presente. La separazione sostanziale può includere composizioni contenenti almeno circa 50%, almeno circa 60%, almeno circa 70%, almeno circa 80%, almeno circa 90%, almeno circa 95%, almeno circa 97%, o almeno circa 99% in peso dei sali descritti nella presente, o il suo sale. Metodi per isolare i composti e loro sali sono routinari nella tecnica.

Si apprezza che alcune caratteristiche dell'invenzione, che, per chiarezza, sono descritte nel contesto di forme di realizzazione separate, possono anche essere fornite in combinazione in una singola forma di realizzazione (mentre le forme di realizzazione sono intese combinate come se fossero scritte in una forma multipla dipendente). Viceversa, varie caratteristiche dell'invenzione che, per brevità, sono descritte nel contesto di una singola forma di realizzazione, possono anche essere fornite separatamente o in qualsiasi adeguata sottocombinazione.

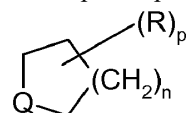
In vari punti della presente descrizione, i sostituenti di composti dell'invenzione sono descritti in gruppi o in intervalli. Si intende in particolare che l'invenzione includa ogni singola subcombinazione dei membri di tali gruppi e intervalli. Ad esempio, il termine "C₁₋₆ alchile" è inteso in particolare descrivere singolarmente metile, etile, C₃ alchile, C₄ alchile, C₅ alchile e C₆ alchile.

In vari punti nella presente descrizione, sono descritti sostituenti di legame. Se la struttura chiaramente richiede un gruppo di legame, le variabili di Markush elencate per tale gruppo sono intese come gruppo di legame. Ad esempio, se la struttura richiede un gruppo di legame e la definizione del gruppo di Markush per tale variabile elenca "alchile" o "arile", allora si deve intendere che l'"alchile" o l'"arile" rappresenta un gruppo alchilene di legame o un gruppo arilene, rispettivamente.

In vari punti, nella presente descrizione, sono descritti anelli (ad es., "un anello piperidina"). Salvo diversamente specificato, questi anelli possono essere attaccati alla parte restante della molecola in qualsiasi membro dell'anello come consentito dalla valenza. Ad esempio, il termine "un anello 2H-tetraidropirano" può riferirsi a un anello 2H-tetraidropiran-2-ile, 2H-tetraidropiran-3-ile, 2H-tetraidropiran-4-ile, eccetera.

Il termine "a n-membri" in cui n è un numero intero descrive tipicamente il numero di atomi formanti l'anello in una parte caratteristica in cui il numero di atomi formanti l'anello è n. Ad esempio, 2H-tetraidropirano è un esempio di un anello eterocicloalchile a 6 membri, 1H-1,2,4-triazolo è un esempio di un anello eteroarile a 5 membri, piridina è un esempio di un anello eteroarile a 6-membri e 1,2,3,4-tetraidro-naftalene è un esempio di un gruppo cicloalchile a 10 membri.

Per i composti dell'invenzione in cui una variabile si presenta più di una volta, ogni variabile può avere una parte caratteristica diversa indipendentemente selezionata dal gruppo che definisce la variabile. Ad esempio, se è descritta una struttura avente due gruppi R che sono simultaneamente presenti sullo stesso composto, i due gruppi R possono rappresentare diverse parti caratteristiche indipendentemente selezionate dal gruppo definito per R. In un altro esempio, quando un sostituito multiplo è opzionalmente indicato nella forma:



si deve quindi intendere che il sostituito R può presentarsi p numero di volte sull'anello, e R può essere una diversa parte caratteristica ad ogni occorrenza. Si deve intendere che ogni gruppo R può sostituire qualsiasi atomo di idrogeno attaccato ad un atomo dell'anello, inclusi uno o entrambi gli atomi idrogeno di (CH₂)_n. Inoltre, nel suddetto esempio, se la variabile Q dovesse essere definita come comprendente idrogeni, ad esempio quando Q è indicato come CH₂, NH, ecc. qualsiasi sostituito sospeso quale R nel suddetto esempio, può sostituire un idrogeno della variabile Q nonché un idrogeno in un qualsiasi altro componente non variabile dell'anello.

Come usata nella presente, la frase "opzionalmente sostituito" indica non sostituito o sostituito. Come usato nella presente, il termine "sostituito" indica che un atomo di idrogeno è rimosso e sostituito da un sostituito. Occorre intendere che la sostituzione ad un dato atomo è limitata dalla valenza.

Come usato nella presente, il termine "C_{n-m} alchile", impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce ad un gruppo idrocarburico saturo che può essere a catena lineare o ramificato, avente da n a m atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchile contiene da 1 a 6, da 1 a 4 o da 1 a 3 atomi di carbonio. Esempi di parti caratteristiche alchile includono, ma senza limitazione, gruppi chimici quali metile, etile, n-propile, isopropile, n-butile, isobutile, *sec*-butile, *terz*-butile, n-pentile, 2-metile-1-butile, 3-pentile, n-

esile, 1,2,2,-trimetilpropile, e simili.

Come usato nella presente, il termine "alchilene", impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce ad un gruppo di legame alchile bivalente, che può essere a catena ramificata o lineare, in cui due sostituenti possono essere attaccati in qualsiasi posizione del gruppo di legame alchilene. Esempi di gruppi alchilene includono, ma senza limitazione, etan-1,2-diile, propan-1,3-diile, propan-1,2-diile, e simili.

Come usato nella presente, " C_{n-m} alchenile" si riferisce a un gruppo alchile avente uno o più doppi legami carbonio-carbonio e avente da n a m atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, la parte caratteristica alchenile contiene da 2 a 3 atomi di carbonio. Gruppi alchenile esemplificativi includono, ma senza limitazione, etenile, n -propenile, isopropenile, n -butenile, *sec*-butenile, e simili.

Come usato nella presente, " C_{n-m} alchinile" si riferisce ad un gruppo alchile avente uno o più tripli legami carbonio-carbonio e avente da n a m atomi di carbonio. Esempi di gruppi alchinile includono, ma senza limitazione, etinile, propin-1-ile, propin-2-ile, e simili. In alcune forme di realizzazione, la parte caratteristica alchinile contiene da 2 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, il termine " C_{1-3} alcossi" impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce ad un gruppo di formula -O-alchile, in cui il gruppo alchile ha da 1 a 3 atomi di carbonio. Gruppi alcossi esemplificativi includono metossi, etossi, e propossi (ad es., n -propossi e isopropossi).

Come usato nella presente, il termine " CF_3 - C_{1-3} idrossialchile" si riferisce ad un gruppo C_{1-3} alchile sostituito da un gruppo CF_3 e un gruppo OH.

I gruppi C_{1-3} in $(C_{1-3} \text{ alchile})_2N$ -, $(C_{1-3} \text{ alchile})_2N-S(=O)_2NH$ -, e $(C_{1-3} \text{ alchile})_2N-C(=O)NH$ - possono essere uguali o diversi.

Come usato nella presente, il termine "carbossi" si riferisce ad un gruppo di formula $-C(=O)OH$.

Come usato nella presente, il termine "carbammile" si riferisce ad un gruppo di formula $-C(=O)-NH_2$.

Come usato nella presente, il termine " C_{1-3} alchilcarbammile" si riferisce ad un gruppo di formula $-C(=O)-NH(\text{alchile})$, in cui il gruppo alchile ha da 1 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, il termine "di(C_{1-3} -alchil)carbammile" si riferisce ad un gruppo di formula -

$C(=O)N(\text{alchile})_2$, in cui i due gruppi alchile hanno ognuno, indipendentemente, da 1 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, il termine "HO- C_{n-m} -alchile" si riferisce ad un gruppo di formula –alchilene-OH, in cui detto gruppo alchilene ha da n a m atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchilene ha da 1 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, il termine " C_{o-p} alcossi- C_{n-m} -alchile" si riferisce ad un gruppo di formula –alchilene-O-alchile, in cui detto gruppo alchilene ha da n a m atomi di carbonio e detto gruppo alchile ha da o a p atomi di carbonio. In alcune forme di realizzazione, i gruppi alchile e alchilene hanno ognuno indipendentemente da 1 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, "alo" o "alogeno" impiegati da soli o in combinazione con altri termini, includono fluoro, cloro, bromo e iodio. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alo è fluoro o cloro.

Come usato nella presente, il termine " C_{n-m} aloalchile" impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce ad un gruppo C_{n-m} alchile avente fino a $\{2(\text{da } n \text{ a } m)+1\}$ atomi di alogeno che possono essere o uguali o diversi. In alcune forme di realizzazione, gli atomi di alogeno sono atomi di fluoro. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchile ha da 1 a 6 o da 1 a 3 atomi di carbonio. Gruppi aloalchile esemplificativi includono CF_3 , C_2F_5 , CHF_2 , CCl_3 , $CHCl_2$, C_2Cl_5 e simili. In alcune forme di realizzazione, il gruppo aloalchile è un gruppo fluoroalchile.

Come usato nella presente, il termine " C_{1-3} fluoroalchile" si riferisce ad un gruppo C_{1-3} alchile che può essere parzialmente o completamente sostituito da atomi di fluoro.

Come usato nella presente, " C_{n-m} aloalcossi" si riferisce a un gruppo di formula –O-alochile avente da n a m atomi di carbonio. Un gruppo aloalcossi esemplificativo è OCF_3 . In alcune forme di realizzazione, il gruppo aloalcossi è soltanto fluorurato. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchile ha da 1 a 6 o da 1 a 4 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, il termine "ciano- C_{n-m} alchile" si riferisce ad un C_{n-m} alchile sostituito da un gruppo ciano. In alcune forme di realizzazione, il gruppo alchile ha da 1 a 3 atomi di carbonio.

Come usato nella presente, la presenza del termine "monociclico" prima del nome di una parte caratteristica

indica che la parte caratteristica ha un singolo anello.

Come usato nella presente, il termine "fenilalchile" si riferisce ad un gruppo di formula –alchilene-fenile. In alcune forme di realizzazione, fenilalchile è fenil-C₁₋₃ alchile.

Come usato nella presente, il termine "cicloalchile", impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce ad una parte caratteristica idrocarburica ciclica non-aromatica, che può opzionalmente contenere uno o più gruppi alchenilene come parte della struttura ciclica. Gruppi cicloalchile possono includere sistemi ciclici monociclici o policiclici (ad es., aventi 2, 3 o 4 anelli fusi, spirociclici o a ponte). Nella definizione di cicloalchile sono incluse anche parti caratteristiche che hanno uno o più anelli aromatici fusi (ossia, aventi un legame in comune con) all'anello cicloalchile, ad esempio, benzoderivati di ciclopentano, ciclopentene, cicloesano e simili. Uno o più atomi di carbonio formanti l'anello di un gruppo cicloalchile può essere ossidato per formare legami carbonile. In alcune forme di realizzazione, cicloalchile è un cicloalchile a 3-7 membri che è monociclico o biciclico. In alcune forme di realizzazione, cicloalchile è cicloalchile monociclico 3-6 o 3-7. Gruppi cicloalchile esemplificativi includono 1,2,3,4-tetraidronaftalene, ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, cicloeptile, ciclopentenile, cicloesenile, cicloesadienile, cicloeptatrienile, norbornile, norpinile, norcarnile, adamantile e simili. In alcune forme di realizzazione, il gruppo cicloalchile è ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile o cicloesile.

Come usato nella presente, il termine "cicloalchilalchile" si riferisce ad un gruppo di formula –alchilene-cicloalchile. In alcune forme di realizzazione, cicloalchilalchile è C₃₋₇ cicloalchil-C₁₋₃ alchile, in cui la porzione cicloalchile è monociclica.

Come usato nella presente, il termine "eteroarile", impiegato da solo o con altri termini, si riferisce ad una parte caratteristica idrocarburica aromatica, monociclica o policiclica (ad es., avente 2, 3, o 4 anelli fusi) avente uno o più membri nell'anello eteroatomico selezionati tra azoto, zolfo e ossigeno. In alcune forme di realizzazione, eteroarile è un eteroarile a 5-6 membri che è monociclico o biciclico, comprendente da 1 a 5 atomi di carbonio e 1, 2, 3 o 4 membri nell'anello eteroatomico indipendentemente selezionati tra azoto, zolfo e ossigeno. Quando il gruppo eteroarile contiene più di un membro nell'anello eteroatomico, gli eteroatomi possono essere uguali o

diversi. Gruppi eteroarile esemplificativi includono, ma senza limitazione, piridina, pirimidina, pirazina, piridazina, pirrolo, pirazolo, azolile, ossazolo, tiazolo, imidazolo, furano, tiofene, o simili.

Un eteroarile con anello a cinque membri è un eteroarile con un anello avente cinque atomi nell'anello in cui uno o più (ad es., 1, 2 o 3) atomi nell'anello sono indipendentemente selezionati tra N, O e S. Eteroarili con anello a cinque membri esemplificativi sono tienile, furile, pirrolile, imidazolile, tiazolile, ossazolile, pirazolile, isotiazolile, isossazolile, 1,2,3-triazolile, tetrazolile, 1,2,3-tiadiazolile, 1,2,3-ossadiazolile, 1,2,4-triazolile, 1,2,4-tiadiazolile, 1,2,4-ossadiazolile, 1,3,4-triazolile, 1,3,4-tiadiazolile e 1,3,4-ossadiazolile.

Un eteroarile con anello a sei membri è un eteroarile con un anello avente sei atomi nell'anello in cui uno o più (ad es., 1, 2 o 3) atomi nell'anello sono indipendentemente selezionati tra N, O e S. Eteroarili con anello a sei membri esemplificativi sono piridile, pirazinile, pirimidinile, triazinile e piridazinile.

Come usato nella presente, il termine "eteroarilalchile" si riferisce ad un gruppo di formula -alchilene-eteroarile. In alcune forme di realizzazione, eteroarilalchile è un eteroaril-C₁₋₃ alchile a 5-6 membri in cui la porzione eteroarile è monociclica, comprendente da 1 a 5 atomi di carbonio e 1, 2, 3 o 4 membri nell'anello eteroatomico, indipendentemente selezionati tra azoto, zolfo e ossigeno.

Come usato nella presente, il termine "eterocicloalchile", impiegato da solo o in combinazione con altri termini, si riferisce al sistema ciclico non-aromatico, che può opzionalmente contenere uno o più gruppi alchenilene o alchinilene come parte della struttura ciclica e che ha almeno un membro nell'anello eteroatomico indipendentemente selezionato tra azoto, zolfo e ossigeno. Quando i gruppi eterocicloalchile contengono più di un eteroatomo, gli eteroatomi possono essere uguali o diversi. I gruppi eterocicloalchile possono includere sistemi ciclici monociclici o policiclici (ad es. aventi 2, 3 o 4 anelli fusi, spirociclici o a ponte). Sono incluse anche nella definizione di eterocicloalchile parti caratteristiche che hanno uno o più anelli aromatici fusi (ossia, aventi un legame in comune con) l'anello non-aromatico, ad esempio, 1,2,3,4-tetraidro-chinolina e simili. Gli atomi di carbonio o eteroatomi nell'anello (negli anelli) del gruppo eterocicloalchile possono essere ossidati così da formare un gruppo carbonile o solfonile (o altro legame ossidato) o un atomo di azoto può essere quaternizzato. In alcune forme di realizzazione, eterocicloalchile è un eterocicloalchile a 4-7 membri che è

monociclico, comprendente 2-6 atomi di carbonio e 1,2,3 o 4 membri nell'anello eteroatomico indipendentemente selezionati tra azoto, zolfo e ossigeno. Esempi di gruppi eterocicloalchile includono azetidina, azepano, pirrolidina, piperidina, piperazina, morfolina, tiomorfolina, pirano, e un anello 2-osso-1,3-ossazolidina.

Come usato nella presente, il termine "eterocicloalchilalchile" si riferisce ad un gruppo di formula -alchilene-eterocicloalchile. In alcune forme di realizzazione, eterocicloalchile è un eterocicloalchile-C₁₋₃ alchile a 4-7 membri, in cui la porzione eterocicloalchile è monociclica, comprendente 2-6 atomi di carbonio e 1, 2, 3, o 4 membri nell'anello eteroatomico indipendentemente selezionati tra azoto, zolfo e ossigeno.

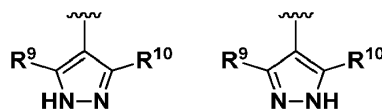
I composti descritti nella presente possono essere asimmetrici (*ad es.*, aventi uno o più stereocentri). Tutti gli stereoisomeri, quali gli enantiomeri e i diastereomeri, sono intesi salvo diversamente indicato. Composti della presente invenzione che contengono atomi di carbonio asimmetricamente sostituiti possono essere isolati in forme otticamente attive o racemiche. I metodi su come preparare forme otticamente attive da materiali di partenza otticamente inattivi sono ben noti nella tecnica, ad esempio mediante risoluzione di miscele racemiche o mediante sintesi stereoselettiva. Molti isomeri geometrici di olefine, doppi legami C=N, e simili, possono essere presenti nei composti descritti nella presente e tutti tali isomeri stabili sono contemplati nella presente invenzione. Gli isomeri geometrici *cis* e *trans* dei composti della presente invenzione sono descritti e possono essere isolati come miscela di isomeri o come forme isomeriche separate.

La risoluzione di miscele racemiche di composti può essere eseguita mediante qualsiasi dei numerosi metodi noti nella tecnica. Un metodo esemplificativo include ricristallizzazione frazionale usando un acido risoluzione chirale che è un acido organico formante sale otticamente attivo. Agenti di risoluzione adeguati per metodi di ricristallizzazione frazionale sono, ad esempio, acidi otticamente attivi quali le forme D e L dell'acido tartarico, acido diacetiltartarico, acido dibenzoiltartarico, acido mandelico, acido malico, acido lattico o i vari acidi camforsolfonici otticamente attivi quali acido β-camforsolfonico. Altri agenti di risoluzione adeguati per metodi di cristallizzazione frazionali includono forme stereoisomericamente pure di α-metilbenzilammina (*ad es.*, forme *S* e *R*, o forme diastereomericamente pure), 2-fenilglicinolo, norefedrina, efedrina, N-metilefedrina,

cicloesiltilammina, 1,2-diamminocicloesano, e simili.

La risoluzione di miscele racemiche può anche essere condotta mediante eluizione su una colonna impaccata con un agente di risoluzione otticamente attivo (*ad es.*, dinitrobenzoilfenilglicina). La composizione di solvente di eluizione adeguata può essere determinata da un esperto nella tecnica.

I composti dell'invenzione includono anche forme tautomeriche. Forme tautomeriche risultano dallo scambio di un singolo legame con un doppio legame adiacente unitamente alla migrazione concomitante di un protone. Forme tautomeriche includono tautomeri prototropici che sono stati di protonazione isomerica aventi la stessa formula empirica e la stessa carica totale. Tautomeri prototropici esemplificativi includono coppie chetone-enolo, coppie ammido-acido immidico, coppie lattame-lattime, coppie enammina-immina e forme anulari in cui un protone può occupare due o più posizioni di un sistema eterociclico, ad esempio, 1H- e 3H-imidazolo, 1H-, 2H- e 4H- 1,2,4-triazolo, 1H- e 2H-isoindolo, e 1H e 2H-pirazolo. Forme tautomeriche possono essere in equilibrio o stericamente bloccate in una forma mediante sostituzione adeguata. Ad esempio, si riconoscerà che il seguente anello pirazolo può formare due tautomeri:



E' inteso che le rivendicazioni coprono entrambi i tautomeri.

I composti dell'invenzione possono anche includere tutti gli isotopi di atomi che si presentano negli intermedi o composti finali. Isotopi includono gli atomi aventi lo stesso numero atomico ma diversi numeri di massa. Ad esempio, isotopi di idrogeno includono trizio e deuterio. In alcune forme di realizzazione, 1, 2, o 3 gruppi CH₂ nell'anello azetidina di Formula I sono sostituiti da un gruppo CHD o CD₂. In alcune forme di realizzazione, 1, 2, o 3 gruppi CH₂ o CH nell'anello piperidina di Formula I sono sostituiti da un gruppo CHD, CD₂ o CD, rispettivamente. In alcune forme di realizzazione, 1, 2, 3, 4 o 5 gruppi CH₂ o CH nell'anello piperidina di Formula I sono sostituiti da un gruppo CHD, CD₂ o CD, rispettivamente.

Il termine, "composto", come usato nella presente intende includere tutti gli stereoisomeri, gli isomeri geometrici, i tautomeri e gli isotopi delle strutture illustrate. Inoltre, nei composti qui identificati dal nome o struttura come una particolare forma tautomerica intendono includere altre forme tautomeriche salvo

diversamente specificato.

Tutti i composti, e loro sali farmaceuticamente accettabili, possono essere trovati unitamente ad altre sostanze quali acqua e solventi (ad es., idrati e solvati) oppure possono essere isolati.

In alcune forme di realizzazione, i composti dell'invenzione, o loro sali, sono sostanzialmente isolati. Con "sostanzialmente isolato" si intende che il composto è almeno parzialmente o sostanzialmente separato dall'ambiente in cui è stato formato o rivelato. La separazione parziale può includere, ad esempio, una composizione arricchita dei composti dell'invenzione. La separazione sostanziale può includere composizioni contenenti almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90%, almeno circa il 95%, almeno circa il 97%, o almeno circa il 99% in peso dei composti dell'invenzione, o loro sale. Metodi per isolare i composti e loro sali sono routinari nella tecnica.

La frase "farmaceuticamente accettabile" è impiegata nella presente per far riferimento ai composti, materiali, composizioni e/o alle forme di dosaggio che rientrano nell'ambito della valutazione medica ragionevole, adeguatamente per l'uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica o altro problema o complicanza, commisurata ad un rapporto beneficio/rischio ragionevole.

Le espressioni "temperatura ambiente" e "temperatura dell'ambiente" come usate nella presente, sono comprese nella tecnica e si riferiscono in generale alla temperatura, *ad es.*, una temperatura di reazione che è all'incirca la temperatura dell'ambiente in cui la reazione viene condotta, ad esempio, una temperatura da circa 20°C a circa 30°C.

Descritti qui sono anche sali farmaceuticamente accettabili dei composti descritti nella presente. Come usata nella presente, "sali farmaceuticamente accettabili" si riferisce a derivati dei composti descritti in cui il composto progenitore è modificato convertendo un acido esistente o parte caratteristica basica nella sua forma di sale. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono, ma senza limitazione, sali di acidi minerali o organici di residui basici quali ammine; sali alcalini o organici di residui acidi quali acidi carbossilici; e simili. I sali farmaceuticamente accettabili della presente invenzione includono i sali non-tossici del composto progenitore formato, ad esempio, da acidi inorganici o organici non-tossici. I sali farmaceuticamente accettabili della

presente invenzione possono essere sintetizzati dal composto progenitore che contiene una parte caratteristica basica o acida mediante metodi chimici tradizionali. In generale, tali sali possono essere preparati facendo reagire le forme di acido libero o base libera di questi composti con una quantità stechiometrica della base o dell'acido adeguato in acqua o in un solvente organico, o in una miscela dei due; in generale, mezzi non-acquosi quali etere, etilacetato, alcol (ad es., metanolo, etanolo, iso-propanolo, o butanolo) o acetonitrile (ACN) sono preferiti. Elenchi di sali adeguati si trovano in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pag. 1418 e *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977). In alcune forme di realizzazione, i composti descritti nella presente includono le forme N-ossido.

Sintesi

I composti dell'invenzione, compresi i loro sali, possono essere preparati usando tecniche di sintesi organica note e possono essere sintetizzati secondo una qualsiasi delle numerose vie di sintesi possibili, quali quelli negli Schemi sotto. Le reazioni per preparare i composti dell'invenzione possono essere eseguite in solventi adeguati che possono essere facilmente selezionati da un esperto nella tecnica della sintesi organica. Solventi adeguati possono essere sostanzialmente non-reattivi con i materiali di partenza (reagenti), gli intermedi o i prodotti alle temperature alle quali le reazioni sono eseguite, *ad es.*, temperature che possono variare dalla temperatura di congelamento del solvente alla temperatura di ebollizione del solvente. Una data reazione può essere realizzata in un solvente o una miscela di più di un solvente. A seconda del passaggio di reazione particolare, solventi adatti per un particolare passaggio di reazione possono essere selezionati dall'esperto.

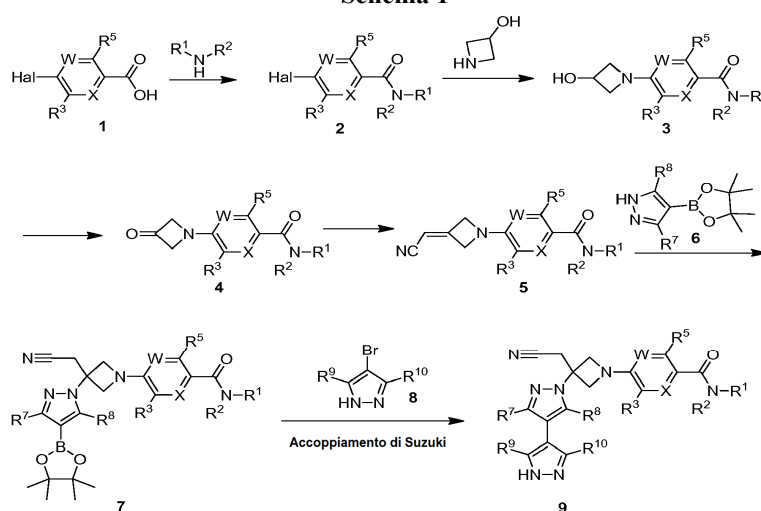
La preparazione di composti dell'invenzione può implicare la protezione e la deprotezione di vari gruppi chimici. La necessità di protezione e deprotezione, e la selezione di adeguati gruppi protettori possono essere facilmente determinate da un esperto nella tecnica. La chimica dei gruppi protettori può essere trovata, ad esempio, in Wuts and Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4^a ed., John Wiley & Sons: New Jersey, (2007).

Le reazioni possono essere monitorate secondo un qualsiasi metodo adeguato noto nella tecnica. Ad esempio, la formazione di prodotto può essere monitorata mediante mezzi spettroscopici, quali spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (ad es., ¹H o ¹³C), spettroscopia ad infrarossi, spettrofotometria (ad es., UV-visibile),

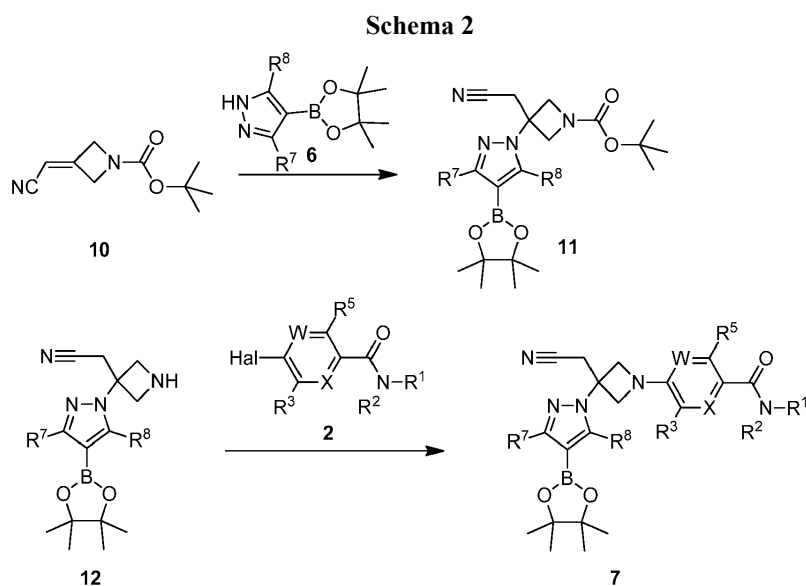
spettrometria di massa, o mediante metodi cromatografici quali cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) o cromatografia su strato sottile (TLC).

I composti di Formula I possono essere sintetizzati mediante procedure analoghe a quelle negli schemi sotto. Una serie di derivati di bi-pirazolo **9** può essere preparata secondo i metodi delineati nello Schema 1. Un acido aromatico **1** può essere adeguatamente convertito nella corrispondente ammido **2** usando il reagente di accoppiamento ammidico quali BOP, PyOP, HATU, HBTU, EDC o CDI. La sostituzione del gruppo uscente Hal (Hal può essere alogeno, OTs o OTf) in **2** con 3-idrossiazetidina per produrre il composto **3** può essere ottenuta in condizioni termiche in un solvente adeguato, quale, ma senza limitazione, DMSO, diossano, DMF, o NMP in presenza di una base quale carbonato di potassio, carbonato di cesio, o carbonato di sodio; o in condizioni di reazione di *N*-arilazione del tipo Ullmann catalizzata da rame usando ioduro di rame (I) e carbonato di potassio; o in condizioni di reazione che formano un legame C-N catalizzate da palladio usando xantpos, BINAP o P8o-Tol)₃ come legante e carbonato di potassio o carbonato di cesio come base. Nitrile α,β -insaturo **5** può essere ottenuto mediante reazione di Wittig di dietil cianometilfosfonato con il chetone **4** che può essere preparato mediante ossidazione di Swern di **3**. L'addizione di Michael di **6** con nitrile α,β -insaturo **5** può fornire l'estere boronico **7**. L'accoppiamento di Suzuki dell'estere boronico **7** con un alogenuro di pirazolo **8** può fornire il corrispondente derivato di bi-pirazolo **9**.

Schema 1

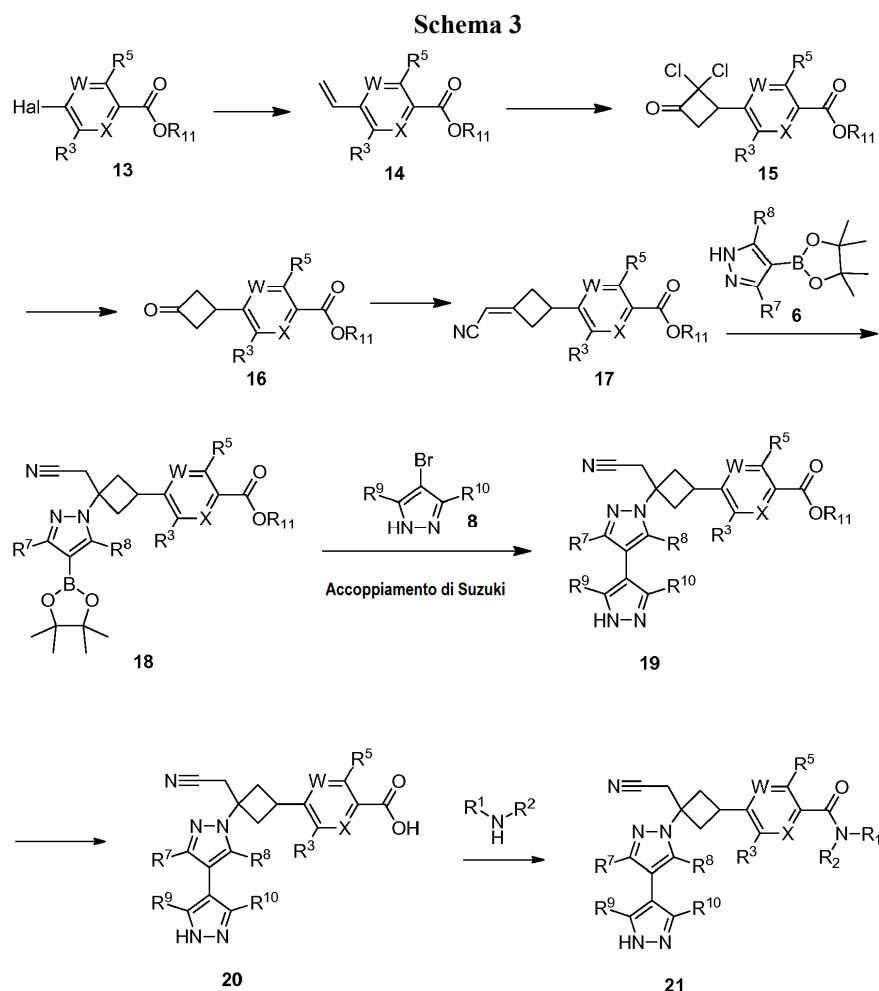


Una serie di derivati di estere boronico **7** può essere preparata secondo le procedure delineate nello Schema 2. L'addizione di Michael di **6** con un nitrile α,β -insaturo **10** può fornire l'estere boronico **11**. La rimozione del gruppo Boc può essere ottenuta in condizioni acide per fornire la corrispondente ammina **12**. La sostituzione del gruppo uscente Hal in **2** con **12** può produrre l'estere boronico **7** in condizioni termiche in un solvente adatto quale, ma senza limitazione, acetonitrile, DMSO, diossano, DMF o NMP in presenza di una base quale carbonato di potassio, carbonato di cesio, carbonato di sodio, base di Hunig o DBU.



Una serie di derivati di bi-pirazolo **21** può essere preparata secondo i metodi delineati nello Schema 3. Esteri alo-aromatici **13** possono essere convertiti nei corrispondenti alcheni **14** mediante accoppiamento di Suzuki degli esteri alo-aromatici **13** con esteri vinil boronici. Alcheni **14** possono essere fatti reagire con cheteni adeguatamente sostituiti (quali diclorochetene) con 2+2 cicloaddizioni per fornire i diclorociclobutanoni **15**. In condizioni riducenti (quali zinco in acido acetico in condizioni termiche) i diclorociclobutanoni **15** possono essere convertiti in ciclobutanoni **16**. Nitrili α,β -insaturi **17** possono essere formati mediante reazione dei ciclobutanoni **16** con reagente di Horner-Wadsworth-Emmons. Esteri boronici **6** possono essere fatti reagire con nitrili α,β -insaturi **17** in condizioni di addizione di Michael in presenza di agenti di accoppiamento per fornire i composti **18**. L'accoppiamento di Suzuki degli esteri boronici **18** con gli alogenuri di pirazolo adeguati **8** può

fornire i corrispondenti bi-pirazoli **19**. L'idrolisi di esteri **19** in condizioni basiche può fornire gli acidi **20**. Le ammidi **21** possono essere sintetizzate mediante accoppiamento di acidi **20** con ammine adeguatamente sostituite usando reagenti di accoppiamento ammidico quali BOP, PyBop, HATU, HBTU, EDC o CDI.



Procedimenti

La presente domanda fornisce un procedimento per formare i sali descritti nella presente comprendenti il far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con un acido selezionato tra acido fosforico, acido cloridrico, acido bromidrico e acido solforico per formare il loro sale. In alcune forme di realizzazione, il procedimento utilizza da circa 0,55

a 1,5 equivalenti dell'acido per equivalente di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide.

In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con acido fosforico in un componente solvente ad una temperatura al di sopra della temperatura ambiente per formare il sale dell'acido fosforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, la temperatura è da circa 40°C a circa 70°C. In alcune forme di realizzazione, la temperatura è da circa 45°C a circa 55°C. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende etanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende acetonitrile. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende metanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende metanolo e isopropanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende metanolo, isopropanolo e n-eptano. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre raffreddare la miscela a temperatura ambiente e filtrare per isolare il sale. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre rimuovere una porzione del solvente così da formare una miscela concentrata prima di detta filtrazione. In alcune forme di realizzazione, una porzione del solvente è rimossa mediante distillazione.

La presente domanda fornisce inoltre un procedimento di formare il sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico, comprendente far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con acido fosforico in un componente solvente comprendente metanolo e isopropanolo ad una temperatura da circa 40°C a circa 70°C per formare una miscela comprendente il sale dell'acido fosforico del sale di acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre, aggiungere n-eptano alla miscela ad una temperatura

da circa 40°C a circa 70°C per formare una seconda miscela. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura da circa 45°C a circa 55°C. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura di circa 50°C.

In alcune forme di realizzazione, la presente domanda fornisce inoltre un procedimento di preparazione di sale dell'acido fosforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide, comprendente:

(a) dissolvere il sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico in metanolo ad una temperatura da circa 40°C a circa 70°C per formare una prima miscela;

(b) aggiungere n-eptano alla prima miscela ad una temperatura da circa 40°C a circa 70°C per formare una seconda miscela; e

(c) raffreddare la seconda miscela per fornire il sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico.

In alcune forme di realizzazione, il procedimento della precedente forma di realizzazione comprende inoltre distillare almeno una porzione del metanolo dalla prima miscela prima del passaggio (b). In alcune forme di realizzazione, il procedimento della precedente forma di realizzazione comprende inoltre distillare almeno una porzione del metanolo e/o di n-eptano dalla seconda miscela prima della fase (c). In alcune forme di realizzazione, i passaggi (a) e (b) sono eseguiti a una temperatura da circa 45°C a circa 55°C. In alcune forme di realizzazione, i passaggi (a) e (b) sono eseguiti a una temperatura di circa 50°C.

In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con acido cloridrico in un componente solvente ad una temperatura al di sopra della temperatura ambiente per formare il sale dell'acido cloridrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura all'incirca a temperatura ambiente. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente

comprende 2-butanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo e isopropilacetato. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre filtrare per isolare il sale. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre lavare il sale isolato con metil *terz*-butil etere.

In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con acido bromidrico in un componente solvente ad una temperatura al di sopra della temperatura ambiente per formare l'acido bromidrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura all'incirca a temperatura ambiente. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprendente isopropanolo e acqua. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre filtrare per isolare il sale. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre lavare il sale isolato con metil *terz*-butil etere.

In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende far reagire 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide con acido solforico in un componente solvente per formare il sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura all'incirca a temperatura ambiente. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre filtrare per isolare il sale. In alcune forme di realizzazione, la reazione è eseguita ad una temperatura all'incirca a 60°C. In alcune forme di realizzazione, il componente solvente comprende isopropanolo e acqua. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre raffreddare la miscela a temperatura ambiente e filtrare per isolare il sale. In alcune forme di realizzazione, il procedimento comprende inoltre lavare il sale isolato con metil *terz*-butiletere.

Metodi

Composti descritti qui sono inibitori di JAK e la maggior parte dei composti sono inibitori selettivi di JAK1. Un inibitore selettivo di JAK1 è un composto che inibisce l'attività di JAK1 preferibilmente rispetto ad altre Janus chinasi. Ad esempio, i composti dell'invenzione inibiscono preferibilmente JAK1 rispetto a uno o più tra JAK2, JAK3 e TYK2. In alcune forme di realizzazione, i composti inibiscono JAK1, preferibilmente rispetto a JAK2 (ad es., hanno un rapporto IC_{50} di JAK1/JAK2 >1). In alcune forme di realizzazione, i composti sono circa 10 volte più selettivi per JAK1 rispetto a JAK2. In alcune forme di realizzazione, i composti sono circa 3 volte, circa 5 volte, circa 10 volte, circa 15 volte o circa 20 volte più selettivi per JAK1 rispetto a JAK2 come calcolato misurando la IC_{50} a ATP 1 mM (si veda, Esempio A).

JAK1 svolge un ruolo centrale in una serie di vie del fattore di segnalazione citochinica e del fattore di crescita che, quando deregolate possono determinare o contribuire a stati patologici. Ad esempio, i livelli di IL-6 sono elevati nell'artrite reumatoide, una malattia che è stata indicata avere effetti svantaggiosi (Fonesca, J. E. et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Poiché IL-6 segnala, almeno in parte, attraverso JAK1, antagonizzando IL-6 direttamente o indirettamente attraverso l'inibizione di JAK1 ci si attende che fornisca un beneficio clinico (Guschin, D., N., et al *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J.S., et al., *Lancet* 371:987, 2008). Inoltre, in alcuni tumori, JAK1 è mutata determinando crescita e sopravvivenza cellulare del tumore indesiderata costitutiva. (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci U S A*.106:9414-8, 2009; Flex E., et al.*J Exp Med*. 205:751-8, 2008). In altre malattie autoimmuni e tumori i livelli sistemici elevati di citochine infiammatorie che attivano JAK1 possono anche contribuire alla malattia e/o a sintomi associati. Pertanto, pazienti con tali malattie possono trarre beneficio dall'inibizione di JAK1. Inibitori selettivi di JAK1 possono essere efficaci evitando al contempo effetti non necessari e potenzialmente indesiderati di inibizione di altre JAK chinasi.

Gli inibitori selettivi di JAK1, rispetto ad altre JAK chinasi, possono avere molteplici vantaggi terapeutici rispetto a inibitori meno selettivi. Relativamente all'attività contro JAK2, una serie di importanti citochine e fattori di crescita segnalano attraverso JAK2 inclusi, ad esempio, eritropoietina (Epo) e trombopoietina (Tpo) (Parganas E, et al. *Cell*. 93:385-95, 1998). Epo è un fattore di crescita chiave per la produzione di globuli rossi; pertanto, una carenza di segnalazione Epo-dipendente può determinare un numero ridotto di globuli rossi e

anemia (Kaushansky, K, NEJM 354:2034-45, 2006). Tpo, un altro esempio di un fattore di crescita JAK2-dipendente, svolge un ruolo centrale nel controllo della proliferazione e maturazione di megacariociti – le cellule da cui le piastrine sono prodotte (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Pertanto, la segnalazione di Tpo ridotta diminuirebbe il numero di megacariociti (megacariocitopenia) e diminuirebbe il numero di piastrine in circolazione (trombocitopenia). Ciò può determinare sanguinamento indesiderato e/o incontrollabile. L'inibizione ridotta di altre JAK, quali JAK3 e Tyk2, può anche essere desiderabile in quanto gli esseri umani privi di versione funzionale di queste chinasi sono risultati soffrire di numerose malattie quali immunodeficienza grave-combinata o sindrome dell'iperimmunoglobulina E (Minegishi, Y, et al. Immunity 25:745-55, 2006; Macchi P, et al. Nature. 377:65-8, 1995). Pertanto, un inibitore di JAK1 con affinità ridotta per altre JAK avrebbe anche vantaggi significativi rispetto ad un inibitore meno selettivo relativamente ad effetti collaterali ridotti che implicano immuno-soppressione, anemia e trombocitopenia.

Composti descritti qui possono essere utilizzati in metodi di trattamento di una malattia o un disturbo JAK-associato in un individuo (*ad es.* paziente) somministrando all'individuo che necessita di tale trattamento una quantità terapeuticamente o dose terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione o una sua composizione farmaceutica. Una malattia JAK-associata può includere qualsiasi malattia, disturbo o condizione che è direttamente o indirettamente legata all'espressione o all'attività del JAK, inclusa sovraespressione e/o livelli di attività anomali. Una malattia JAK-associata può anche includere qualsiasi malattia, disturbo o condizione che può essere prevenuto, migliorato o curato modulando l'attività di JAK.

Esempi di malattie JAK-associate includono malattie che coinvolgono il sistema immunitario inclusi, ad esempio, rigetto del trapianto d'organo (*ad es.*, rigetto di allotrapianto e malattia del trapianto verso l'ospite).

Ulteriori esempi di malattie JAK associate includono malattie autoimmuni quali sclerosi multipla, artrite reumatoide, artrite giovanile, artrite psoriasica, diabete tipo 1, lupus, malattia infiammatoria dell'intestino, colite ulcerosa, morbo di Crohn, miastenia grave, nefropatie da immunoglobuline, miocardite, disturbi tiroidei autoimmuni, malattia polmonare ostruttiva cronica (COPD), e simili. In alcune forme di realizzazione, la malattia autoimmune è un disturbo cutaneo bolloso autoimmune quale pemfigus vulgaris (PV) o pemfigoide

bolloso (BP).

Ulteriori esempi di malattie JAK-associate includono condizioni allergiche quali asma, allergie alimentari, dermatite eczematosa, dermatite da contatto, dermatite atopica (eczema atopico), e rinite. Ulteriori esempi di malattie JAK-associate includono malattie virali quali Epstein Barr Virus (EBV), Epatite B, Epatite C, HIV, HTLV 1, Varicella Zoster Virus (VZV) e Papilloma Virus Umano (HPV).

Ulteriori esempi di malattia JAK-associata includono malattie associate al turnover cartilagineo, ad esempio, artrite gottosa, artrite settica o infettiva, artrite reattiva, distrofia simpatica riflessa, algodistrofia, sindrome di Tietze, atropatia costale, osteoartrite deformante endemica, malattia di Mseleni, malattia di Handigodu, degenerazione risultante da fibromialgia, lupus eritematoso sistemico, scleroderma o spondilite anchilosante.

Ulteriori esempi di malattia JAK-associata includono malformazioni cartilaginee congenite, incluse condrolisi ereditaria, condrodiplasia, e pseudocrondrodispalsia (ad es., microzia, enozia e condrodiplasia metafisale).

Ulteriori esempi di malattie o condizioni JAK-associati includono disturbi cutanei quali psoriasi (ad esempio, psoriasi vulgare), dermatite atopica, eruzione cutanea, irritazione cutanea, sensibilizzazione cutanea (*ad es.*, dermatite da contatto o dermatite da contatto allergico). Ad esempio, alcune sostanze inclusi alcuni agenti farmaceutici, quando applicati a livello topico possono causare sensibilizzazione cutanea. In alcune forme di realizzazione, la co-somministrazione o la somministrazione sequenziale di almeno un inibitore di JAK dell'invenzione unitamente all'agente che causa sensibilizzazione indesiderata può essere utile a trattare tale sensibilizzazione indesiderata o dermatite. In alcune forme di realizzazione, il disturbo cutaneo è trattato mediante somministrazione topica di almeno un inibitore JAK dell'invenzione.

In ulteriori forme di realizzazione, la malattia JAK-associata è cancro inclusi quelli caratterizzati da tumori solidi (*ad es.*, cancro prostatico, cancro renale, cancro epatico, cancro pancreatico, cancro gastrico, cancro mammario, cancro polmonare, cancri della testa e del collo, cancro tiroideo, glioblastoma, sarcoma di Kaposi, malattia di Castleman, leiomiomasarcoma uterino, melanoma ecc.), cancri ematologici (*ad es.*, linfoma, leucemia quale leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mielogeno acuta (AML), o mieloma multiplo), e cancro cutaneo quale linfoma a cellule T cutaneo (CTCL) e linfoma a cellule B cutaneo. CTCL esemplificativi includono la

sindrome di Sezary e le micosi fungoidi.

In alcune forme di realizzazione, gli inibitori di JAK descritti nella presente, o in combinazioni con altri inibitori di JAK, quali quelli riportati nel brevetto statunitense seriale N. 11/637.545 possono essere usati per trattare cancri associati ad infiammazione. In alcune forme di realizzazione, il cancro è associato alla malattia infiammatoria dell'intestino. In alcune forme di realizzazione, la malattia infiammatoria dell'intestino è colite ulcerosa. In alcune forme di realizzazione, la malattia infiammatoria dell'intestino è il morbo di Crohn. In alcune forme di realizzazione, il cancro associato ad infiammazione è cancro associato a colite. In alcune forme di realizzazione, il cancro associato ad infiammazione è cancro al colon o cancro coloretale. In alcune forme di realizzazione, il cancro è cancro gastrico, tumore carcinoide gastrointestinale, tumore stromale gastrointestinale (GIST), adenocarcinoma, cancro dell'intestino tenue, o cancro rettale.

Malattie JAK-associate possono inoltre includere quelle caratterizzate dall'espressione di: mutanti di JAK2 quali quelli aventi almeno una mutazione nel dominio pseudo-chinasico (*ad es.*, JAK2V617F); mutanti di JAK2 aventi almeno una mutazione all'esterno del dominio pseudo-chinasico; mutanti di JAK1; mutanti di JAK3; mutanti del recettore eritropoietinico (EPOR); o espressione deregolata di CRLF2.

Malattie JAK-associate possono inoltre includere disturbi mieloproliferativi (MPD) quali policitemia vera (PV), trombocitemia essenziale (ET), mielofibrosi con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosi primaria (PMF), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia mielomonocitica cronica (CMML), sindrome ipereosinofila (HES), malattia mastocitica sistemica (SMCD), e simili. In alcune forme di realizzazione, il disturbo mieloproliferativo è la mielofibrosi (*ad es.*, mielofibrosi primaria (PMF) o post-policitemia vera/mielofibrosi da trombocitemia essenziale (Post-PV/ET MF)). In alcune forme di realizzazione, il disturbo mieloproliferativo è mielofibrosi da trombocitemia post-essenziale (Post-ET MF). In alcune forme di realizzazione, il disturbo mieloproliferativo è mielofibrosi post-policitemia vera (Post-PV MF).

In alcune forme di realizzazione, inibitori JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare la sindrome mielodisplastica (MDS) in un paziente che ne necessita. In alcune forme di realizzazione, detto paziente è dipendente da trasfusione di globuli rossi.

Come usato nella presente, le sindromi mielodisplastiche intendono comprendere disturbi ematopoietici eterogenei e clonali che sono caratterizzati da inefficace ematopoiesi su una o più delle linee cellulari mieloidi maggiori. Le sindromi mielodisplastiche sono associate a danno del midollo osseo, citopenia di sangue periferico ed una propensione a progredire in leucemia mieloide acuta (AML). Inoltre, anomalie citogenetiche clonali possono essere rivelate in circa il 50% dei casi con MDS. Nel 1997, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) unitamente alla Società per la Ematopatologia (SH) e l'Associazione Europea di Ematopatologia (EAHP) ha proposto nuove classificazioni per neoplasmi ematopoietici (Harris, et al., *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849; Vardiman, et al., *Blood* 2002;100:2292-2302). Per MDS, la OMS non soltanto ha usato i criteri morfologici della classificazione Franco-Americana-Britannica (FAB) ma anche caratteristiche genetiche, biologiche e cliniche disponibili incorporate per definire sottogruppi di MDS (Bennett, et al., *Br J Haematol* 1982;51:189-199). Nel 2008, la classificazione della OMS di MDS (Tabella 1) è stata ulteriormente affinata per consentire una subclassificazione precisa e rilevante dal punto di vista della prognosi di displasia unilineare incorporando nuove informazioni cliniche e scientifiche (Vardiman, et al., *Blood* 2009; 114:937-951; Swerdlow, et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4^a edizione Lione Francia: IARC Press; 2008:88-103; Bunning and Germing, "Myelodysplastic syndromes/neoplasms", Capitolo 5, Swerdlow, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (ed. 4^a edizione): Lione, Francia: IARC Press;2008:88-103).

Tabella 1. Classificazione OMS del 2008 per la sindrome mielodisplastica De Novo.

Sottotipo	Sangue	Midollo osseo
Citopenia refrattaria con displasia unilineare (RCUD)	Citopenia singola o bicitopenia	Displasia in $\geq 10\%$ di 1 linea cellulare, $< 5\%$ blasti
Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS)	Anemia, nessun blasto	$\geq 15\%$ di precursori eritroidi senza sideroblasti anulari, soltanto displasia eritroide, $< 5\%$ blasti

Citopenia refrattaria con displasia multilineare	Citopenia(e), $< 1 \times 10^9/l$ monociti	Displasia in $\geq 10\%$ di cellule in ≥ 2 linee ematopoietiche, $\pm 15\%$ di sideroblasti ad anello, $< 5\%$ blasti
Anemia refrattaria con blasti - 1 in eccesso (RAEB-1)	Citopenia(e), da $\leq 2\%$ a 4% blasti, $< 1 \times 10^9/l$ monociti	Displasia unilineare o multilineare, Nessun corpo di Auer, da 5% a 9% blasti
Anemia refrattaria con blasti-2 in eccesso (RAEB-2)	Citopenia(e), da $\leq 5\%$ a 19% blasti, $< 1 \times 10^9/l$ monociti	Displasia unilineare o multilineare, \pm corpi di Auer, da 10% a 19% blasti
Sindrome mielodisplastica non-classificata (MDS-U)	Citopenie	Displasia unilineare o assenza di displasia ma citogenetica di MDS caratteristica, $< 5\%$ blasti
MDS associata a del(5q) isolato	Anemia, piastrine normali aumentate	Eritroide unilineare. del(5q) isolato, $< 5\%$ blasti

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è citopenia refrattaria con displasia unilineare (RCUD).

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS).

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è citopenia refrattaria con displasia multilineare.

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è anemia refrattaria con blasti-1 in eccesso (RAEB-1).

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è anemia refrattaria con blasti-2 in eccesso (RAEB-2).

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è sindrome mielodisplastica, non-classificata (MDS-U).

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è sindrome mielodisplastica associata a del(5q) isolato.

In alcune forme di realizzazione, la sindrome mielodisplastica è refrattaria ad agenti stimolanti la eritropoiesi.

Composti descritti qui possono essere utilizzati in metodi di trattamento della psoriasi ed altri disturbi cutanei mediante somministrazione di una formulazione topica contenente il composto.

In alcune forme di realizzazione, gli inibitori di JAK descritti nella presente possono essere usati per trattare ipertensione arteriosa polmonare.

Composti descritti qui possono essere utilizzati in un metodo di trattamento di effetti collaterali dermatologici di altri agenti farmaceutici mediante somministrazione del composto dell'invenzione. Ad esempio, numerosi agenti farmaceutici risultano in reazioni allergiche indesiderate che possono manifestare una eruzione acneiforme o dermatite associata. Agenti farmaceutici esemplificativi che hanno tali effetti collaterali indesiderati includono farmaci anti-cancro quali gefitinib, cetuximab, erlotinib e simili. I composti dell'invenzione possono essere somministrati per via sistemica o topica (ad es., localizzati in prossimità della dermatite) in combinazione con (ad es., simultaneamente o sequenzialmente) l'agente farmaceutico avente l'effetto collaterale dermatologico indesiderato. In alcune forme di realizzazione, il composto dell'invenzione può essere somministrato topicamente unitamente a uno o più altri agenti farmaceutici, in cui gli altri agenti farmaceutici, quando somministrati per via topica in assenza di un composto dell'invenzione causano dermatite da contatto, sensibilizzazione da contatto allergico, o simile disturbo cutaneo. Di conseguenza, le composizioni dell'invenzione includono formulazioni topiche contenenti il composto dell'invenzione e un ulteriore agente farmaceutico che può causare dermatite, disturbi cutanei o effetti collaterali associati.

Ulteriori malattie JAK-associate includono infiammazione e malattie infiammatorie. Malattie infiammatorie esemplificative includono sarcoidosi, malattie infiammatorie dell'occhio (*ad es.*, irite, uveite, sclerite, congiuntivite o malattia associata), malattie infiammatorie del tratto respiratorio (*ad es.*, il tratto respiratorio superiore comprendente il naso e i seni nasali quali rinite o sinusite o il tratto respiratorio inferiore comprendente bronchite, malattia polmonare ostruttiva cronica, e simili), miopatia infiammatoria quale miocardite e altre malattie infiammatorie. In alcune forme di realizzazione, la malattia infiammatoria dell'occhio è la blefarite.

Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare lesioni da ripercussione ischemica o una malattia o condizione associata ad un evento ischemico infiammatorio quale ictus o arresto

cardiaco. Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare uno stato patologico endotossina-attivato (*ad es.*, complicanze dopo chirurgia di bypass o stati da endotossine cronici che contribuiscono ad un'insufficienza cardiaca cronica). Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare anoressia, cachessia, o fatica come quella che risulta da o associata al cancro. Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare restenosi, sclerodermite o fibrosi. Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare condizioni associate a ipossia o astrogliosi quali, ad esempio, retinopatia diabetica, cancro o neurodegenerazione. Si veda, ad es., Dudley, A.C. et al. *Biochem. J.* 2005, 390(Pt 2):427-36 e Sriram, K. et al. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(19):19936-47. Epub 2 Marzo 2004. Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono essere usati per trattare il morbo di Alzheimer.

Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare altre malattie infiammatorie quali la sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS) e lo shock settico.

Gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare la gotta e una dimensione della prostata aumentata a causa, ad es., ipertrofia prostatica benigna o iperplasia prostatica benigna.

Ulteriori malattie JAK-associate includono malattie da riassorbimento osseo quali osteoporosi, osteoartrite. Il riassorbimento osseo può anche essere associato ad altre condizioni quali squilibrio ormonale e/o terapia ormonale, malattia autoimmune (ad es., sarcoidosi ossea), o cancro (ad es., mieloma). La riduzione del riassorbimento osseo a causa degli inibitori di JAK può essere di circa il 10%, circa 20%, circa 30%, circa 40%, circa 50%, circa 60%, circa 70%, circa 80% o circa 90%.

In alcune forme di realizzazione, gli inibitori di JAK descritti nella presente possono inoltre essere usati per trattare un disturbo dell'occhio secco. Come usato nella presente, il "disturbo dell'occhio secco" intende comprendere gli stati patologici riepilogati in una relazione ufficiale recente del Dry Eye Workshop (DEWS), che ha definito l'occhio secco come "una malattia multifattoriale delle lacrime e della superficie oculare che determina sintomi di disagio, disturbo visivo, e instabilità del film lacrimale con il potenziale danno della superficie oculare. E' accompagnato da osmolarità aumentata del film lacrimale e infiammazione della superficie oculare". Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and

Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", *The Ocular Surface* 5(2), 75-92 Aprile 2007. In alcune forme di realizzazione, il disturbo dell'occhio secco è selezionato tra occhio secco a carenza di lacrima acquosa (ADDE) o disturbo dell'occhio secco evaporativo o una loro combinazione adeguata. In alcune forme di realizzazione, il disturbo dell'occhio secco è l'occhio secco della sindrome di Sjogren (SSDE). In alcune forme di realizzazione, il disturbo dell'occhio secco è l'occhio secco della sindrome di non-Sjogren (NSSDE).

Composti descritti qui possono essere utilizzati in un metodo di trattamento della congiuntivite, uveite (inclusa uveite cronica) corioidite, retinite, ciclite, sclerite, episclerite, o irite; il trattamento dell'infiammazione del dolore associato al trapianto corneale, LASIK (cheratomileusi in sito laser assistita), cheratectomia fotorefrattiva o LASEK (cheramoleusi sub-epiteliale laser assistita) inibizione della perdita dell'acutezza visiva associata al trapianto corneale, LASIK, cheratectomia fotoreattiva o LASEK; o l'inibizione del rigetto del trapianto in un paziente che ne necessita, compresa la somministrazione ad un paziente di una quantità terapeuticamente efficace del composto dell'invenzione o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

In aggiunta, i composti dell'invenzione o in combinazione con gli inibitori di JAK, quali quelli riportati nel brevetto seriale statunitense N. 11/637.545, possono essere usati per trattare una disfunzione o insufficienza respiratoria associata ad infezione virale quale influenza e SARS.

In alcune forme di realizzazione, descritto è un composto di Formula I, un suo sale farmaceuticamente accettabile, come descritto in qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, per l'uso in un metodo di trattamento di una qualsiasi delle malattie o dei disturbi descritti nella presente. In alcune forme di realizzazione, descritto è l'uso di un composto di Formula I come descritto in una qualsiasi delle forme di realizzazione della presente, per la preparazione di un farmaco per l'uso in un metodo di trattamento di una qualsiasi delle malattie o disturbi descritti nella presente.

Descritto qui è un composto di Formula I come descritto nella presente o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso in un metodo di modulazione di JAK1. In alcune forme di realizzazione, descritto è l'uso dei composti di Formula I come descritto nella presente o un suo sale farmaceuticamente accettabile per la preparazione di un farmaco per l'uso in un metodo di modulazione di JAK1.

Come usato nella presente, il termine "mettere a contatto" si riferisce all'unire insieme le parti caratteristiche indicate nei sistemi *in vitro* o in un sistema *in vivo*. Ad esempio, "mettere a contatto" una JAK con un composto dell'invenzione include la somministrazione di un composto della presente invenzione ad un individuo o a un paziente, quale un essere umano, avente una JAK, nonché, ad esempio, introdurre un composto dell'invenzione in un campione contenente una preparazione cellulare o purificata contenente JAK.

Come usato nella presente, il termine "individuo" o "paziente", usato in modo intercambiabile, si riferisce a qualsiasi animale, inclusi i mammiferi, preferibilmente topi, ratti, altri roditori, conigli, cani, gatti, suini, bovini, pecore, cavalli o primati e in modo massimamente preferibile esseri umani.

Come usata nella presente, la frase "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce alla quantità del composto attivo dell'agente farmaceutico che stimola la risposta biologica o farmacologica che è ricercata in un tessuto, in un sistema, animale, individuo o essere umano da parte di un ricercatore, veterinario, medico o altro clinico. In alcune forme di realizzazione, la quantità terapeuticamente efficace è da circa 5 mg a circa 1000 mg, o da circa 10 mg a circa 500 mg.

Come usato nella presente, il termine "trattare" o "trattamento" si riferisce a uno o più di (1) prevenire la malattia; ad esempio prevenire una malattia, condizione o disturbo in un individuo che può essere predisposto alla malattia, condizione o disturbo ma che non presenta o manifesta ancora la patologia o la sintomatologia della malattia; (2) inibire la malattia; ad esempio, inibire una malattia, condizione o disturbo in un individuo che presenta o manifesta la patologia o la sintomatologia della malattia, condizione o disturbo (ossia, arrestare l'ulteriore sviluppo della patologia e/o della sintomatologia); e (3) migliorare la malattia; ad esempio, migliorare una malattia, condizione o disturbo in un individuo che presenta o manifesta la patologia o la sintomatologia della malattia, condizione o disturbo (ossia, bloccare la patologia e/o la sintomatologia) ad esempio diminuire la gravità della malattia.

Terapie combinate

I metodi descritti nella presente possono inoltre comprendere la somministrazione di uno o più ulteriori agenti terapeutici. L'uno o più ulteriori agenti terapeutici possono essere somministrati ad un paziente simultaneamente

o sequenzialmente.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre la somministrazione di un agente terapeutico aggiuntivo selezionato tra IMiDs, un agente anti-IL-6, un agente anti-TNF- α , un agente ipometilante, e un modificatore della risposta biologica (BRM).

In generale, un BRM è una sostanza ottenuta da organismi viventi per trattare una malattia che può presentarsi naturalmente nell'organismo o può essere prodotta in laboratorio. Esempi di BRM includono IL-2, interferone, vari tipi di fattori stimolanti le colonie, (CSF, GM-CSF, G-CSF), anticorpi monoclonali quali abciximab, etanercept, infliximab, rituximab, trastuzumab, e ascorbato ad alta dose.

In alcune forme di realizzazione, l'agente anti-TNF- α è infliximab, e etanercept.

In alcune forme di realizzazione, l'agente ipometilante è un inibitore della DNA metiltransferasi. In alcune forme di realizzazione, l'inibitore della DNA metiltransferasi è selezionato tra 5 azacitidina e decitabina.

In generale, IMiDs sono agenti immunomodulatori. In alcune forme di realizzazione, IMiD è selezionato tra talidomide, lenalidomide, pomalidomide, CC-11006, e CC-10015.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre somministrare un agente terapeutico aggiuntivo selezionato tra globulina anti-timocitica, fattore stimolante la colonia dei granulociti umano ricombinante (G-CSF), CSF dei granulociti e dei monociti (GM-CSF), un agente stimolante l'eritropoiesi (ESA), e ciclosporina.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre somministrare un inibitore di JAK aggiuntivo al paziente. In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di JAK aggiuntivo è tofacitinib o ruxolitinib.

Uno o più agenti farmaceutici aggiuntivi, quali, ad esempio, chemioterapici, agenti anti-infiammatori, steroidi, immunosoppressivi, nonché P13K δ , mTor, Bcr-Abl, Flt-3, RAF e inibitori delle FAK chinasi, quali, ad esempio, quelle descritte in WO 2006/056399, che è incorporato nella presente per riferimento nella sua interezza, o altri agenti possono essere usati in combinazione con i composti descritti nella presente per il trattamento di malattie, disturbi o condizioni associati a JAK. L'uno o più agenti farmaceutici aggiuntivi possono essere somministrati ad un paziente simultaneamente o sequenzialmente.

Agenti chemioterapici esemplificativi includono inibitori proteosomici (*ad es.*, bortezomib), talidomide,

revlimid, e agenti di danno del DNA quali melfalan, doxorubicina, ciclofosfamide, vincristina, etoposide, carmustina e simili.

Steroidi esemplificativi includono corticosteroidi quali desametasone o prednisone.

Inibitori di Bcr-Abl esemplificativi includono i composti, e loro sali farmaceuticamente accettabili, dei generi e delle specie descritti nel brevetto statunitense N. 5.521.184, WO 04/005281, e brevetto seriale statunitense No. 60/578.491.

Inibitori di Flt-3 adatti esemplificativi includono composti e loro sali farmaceuticamente accettabili, come descritto in WO 03/037347, WO 03/099771, e WO 04/046120.

Inibitori di RAF adeguati esemplificativi includono composti e loro sali farmaceuticamente accettabili, come descritto in WO 00/09495 e WO 05/028444.

Inibitori di FAK adatti esemplificativi includono composti e loro sali farmaceuticamente accettabili, come descritto in WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595, e WO 01/014402.

In alcune forme di realizzazione, uno o più dei composti dell'invenzione possono essere usati in combinazione con uno o più altri inibitori chinasi inclusi imatinib, in particolare per trattare pazienti resistenti all'imatinib o ad altri inibitori chinasi.

In alcune forme di realizzazione, un agente chemioterapico adeguato può essere selezionato tra agenti antimetaboliti, inibitori della topoisomerasi I, analoghi del platino, taxani, antracicline e inibitori di EGFR e loro combinazioni.

In alcune forme di realizzazione, agenti antimetaboliti includono capecitabina, gemcitabina e fluorouracile (5-FU).

In alcune forme di realizzazione, i taxani includono paclitaxel, Abraxane® (particelle legate a proteine di paclitaxel per sospensione iniettabile), e Taxotere® (docetaxel).

In alcune forme di realizzazione, gli analoghi del platino includono ossaliplatino, cisplatino e carboplatino.

In alcune forme di realizzazione, gli inibitori della topoisomerasi I includono irinotecan e topotecan.

In alcune forme di realizzazione, le antracicline includono doxorubicina o formulazioni liposomiali di

doxorubicina.

In alcune forme di realizzazione, l'agente chemioterapico è FOLFIRINOX (5-FU, lecovorin, irinotecan e ossaliplatino). In alcune forme di realizzazione, l'agente chemioterapico è gemcitabina e Abraxane® (particelle legate a proteine di paclitaxel per sospensione iniettabile).

In alcune forme di realizzazione, uno o più inibitori di JAK dell'invenzione può essere usato in combinazione con un agente chemioterapico nel trattamento del cancro, quale mieloma multiplo, e può migliorare la risposta al trattamento rispetto alla risposta al solo agente chemioterapico, senza aggravamento dei suoi effetti tossici. Esempi di agenti farmaceutici aggiuntivi usati nel trattamento del mieloma multiplo, ad esempio, possono includere, senza limitazione, melfalan, melfalan più prednisone [MP], doxorubicina, desametasone e Velcade (bortezomib). Ulteriori agenti aggiuntivi usati nel trattamento del mieloma multiplo includono Bcr-Abl, Flt-3, inibitori delle RAF e delle FAK chinasi. Effetti additivi o sinergici sono esiti desiderabili della combinazione di un inibitore di JAK della presente invenzione con un ulteriore agente. Inoltre, la resistenza di cellule di mieloma multiplo ad agenti quali desametasone può essere reversibile in seguito al trattamento con un inibitore di JAK della presente invenzione. Gli agenti possono essere combinati con i presenti composti in una forma da singolo dosaggio o dosaggio continuo, oppure gli agenti possono essere somministrati simultaneamente o sequenzialmente come forme di dosaggio separate.

In alcune forme di realizzazione, un corticosteroide quale desametasone è somministrato ad un paziente in combinazione con almeno un inibitore di JAK in cui il desametasone è somministrato in modo intermittente anziché in modo continuo.

In alcune ulteriori forme di realizzazione, le combinazioni di uno o più inibitori di JAK dell'invenzione con altri agenti terapeutici possono essere somministrati da un paziente prima di, durante e/o dopo un trapianto di midollo osseo o un trapianto di cellule staminali.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è fluocinolone acetone (Retisert®), o rimexolone (AL-2178, Vexol, Alcon).

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è ciclosporina (Restasis®).

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è un corticosteroide. In alcune forme di realizzazione, il corticosteroide è triamcinolone, desametasone, fluocinolone, cortisone, prednisolone o flumetolone.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è selezionato tra Dehydrex™ (Holles Labs), Civamide (Opko), ialuronato di sodio (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica), ciclosporina (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101(T) (testosterone, Argentis), AGR1012(P) (Argentis), ecabet sodio (Senju-Ista), gefarnato (Santen), acido 15-(s)-idrossieicosatetraenoico (15(S)-HETE), cevilemina, dossiciclina (ALTY-0501, Alacrity), minociclina, iDestrin™ (NP50301, Nascent Pharmaceuticals), ciclosporina A (Nova22007, Novagali), ossitetraclina (duramicina, MOL11901, Lantibio), CF101 (2S,3S,4R,5R)-3,4-diidrossi-5-[6-[(3-iodofenil)metilammino]purin-9-il]-N-metil-ossolan-2-carbammile, Can-Fite Biopharma), voclosporina (LX212 o LX214, Lux Biosciences), ARG103 (Agentis), RX-10045 (analogo di resolvina sintetica, Resolvix), DYN15 (Dyanmis Therapeutics), rivoglitazone (DE011, Daiichi Sanko), TB4 (RegeneRx), OPH-01 (Ophthalmis Monaco), PCS101 (Pericor Science), REV1-31 (Evolutec), Lacritin (Senju), rebamipide (Otsuka-Novartis), OT-551 (Othera), PAI-2 (University of Pennsylvania e Temple University), pilocarpina, tacrolimus, pimecrolimus (AMS981, Novartis), loteprednol etabonato, rituximab, diquafosol tetrasodio (INS365, Inspire), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), deidroepiandrosterone, anachinra, efalizumab, micofenolato di sodio, etanercept (Embrex®), idrossiclorochina, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), actemra, gemcitabina, ossaliplatino, L-asparaginasi, o talidomide.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è un agente anti-angiogenico, un agonista colinergico, un modulatore del recettore di TRP-1, un bloccante il canale del calcio, un secretagogo mucino, uno stimolante di MUC1, un inibitore di calcineurina, un corticosteroide, un agonista del recettore P2Y2, un agonista del recettore muscarinico, un inibitore di mTOR, un altro inibitore di JAK, un inibitore di Bcr-Abl chinasi, un inibitore di Flt-3 chinasi, un inibitore di RAF chinasi e un inibitore di FAK chinasi quali, ad esempio, quelli descritti in WO 2006/056399. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è un derivato di tetraciclina (ad es., minociclina o dossiciclina). In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo si

lega a FKBP12.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è un agente alchilante o un agente di cross-linking del DNA; un agente anti-metabolita/demetilante (ad es., 5-fluorouracile, capecitabina o azacitidina); una terapia anti-ormonale (antagonisti del recettore degli ormoni, SERM, o inibitore di aromatasi); un inibitore mitotico (ad es., vincristina o paclitaxel); un inibitore di topoisomerasi (I o II) (ad es., mitoxantrone e irinotecan); induttori apoptotici (ad es., ABT-737); una terapia con acido nucleico (ad es., antisenso o RNAi); ligandi del recettore nucleare (ad es., agonisti e/o antagonisti: acido retinoico tutto-trans o bexarotene); agenti di targeting epigenetico quali inibitori della istone deacetilasi (ad es., vorinostat), agenti ipometilanti (ad es. decitabina); regolatori della stabilità proteica quali inibitori di Hsp90, ubiquitina e/o molecole ubiquitina simile coniuganti o deconiuganti; o un inibitore di EGFR (erlotinib).

In alcune forme di realizzazione, l'agente/gli agenti terapeutici aggiuntivi sono gocce oculari demulcenti (note anche come "lacrime artificiali"), che includono, ma senza limitazione, composizioni contenenti polivinilalcol, idrossipropilmetilcellulosa, glicerina, glicole polietilenico (ad es., PEG400), o carbosimetilcellulosa. Lacrime artificiali possono favorire il trattamento dell'occhio secco compensando l'umidità e la capacità lubrificante ridotte del film lacrimale. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo è un farmaco mucolitico, quale N-acetil-cisteina, che può interagire con le mucoproteine e, pertanto, ridurre, la viscosità del film lacrimale.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico aggiuntivo include agenti antibiotici, antivirali, antifungini, anestetici, anti-infiammatori inclusi anti-infiammatori non-steroidi e agenti anti-allergici. Esempi di farmaci adeguati includono amminoglicosidi quali amicacina, gentamicina, tobramicina, streptomicina, netilmicina, e canamicina; fluorochinoloni quali ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, lomefloxacina, levofloxacina e enossacina; naftiridina; solfonammidi; polimixin; cloramfenicolo; neomicina; paramomicina; colistimetato; bacitracina; vancomicina; tetracicline; rifampina e suoi derivati ("rifampine"); cicloserine; beta-lattami; cefalosporine; amfotericine; fluconazolo; flucitosina; natamicina; miconazolo; chetoconazolo; corticosteroidi; diclofenac; flurbiprofen; chetorolac; suprofen; cromolyn; lodoxammide; levocabastin,

nafazolina; antazolina; feniramina; o antibiotico azalide.

Formulazioni farmaceutiche e forme di dosaggio.

Quando impiegati come agenti farmaceutici, i composti dell'invenzione possono essere somministrati sotto forma di composizioni farmaceutiche. Queste composizioni possono essere preparate in un modo ben noto nell'arte farmaceutica e possono essere somministrate mediante una varietà di vie, a seconda del fatto che sia desiderato il trattamento locale o sistemico e in base all'area da trattare. La somministrazione può essere topica (inclusa transdermica, epidermica, oftalmica e le membrane mucose incluse somministrazioni intranasale, vaginale e rettale), polmonare (*ad es.*, mediante inalazione o insufflazione o polveri o aerosol, incluso mediante nebulizzatore; intratracheale o intranasale), orale o parenterale. La somministrazione parenterale include iniezione o infusione endovenosa, intraarteriale, sottocutanea, intraperitoneale, intramuscolare o intracraniale, *ad es.*, somministrazione intratecale o intraventricolare.

La somministrazione parenterale può essere sotto forma di una singola dose in bolo o può essere, ad esempio, mediante una pompa di perfusione continua. Composizioni e formulazioni farmaceutiche per la somministrazione topica possono includere cerotti transdermici, unguenti, lozioni, creme, gel, gocce, supposte, spray, liquidi e polveri. Veicolanti farmaceutici tradizionali, a basi acquose, polverose o oleose, addensanti e simili possono essere necessari o desiderabili.

Questa invenzione include anche composizioni farmaceutiche che contengono, come principio attivo, il composto dell'invenzione o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in combinazione con uno o più veicolanti farmaceuticamente accettabili (eccipienti). In alcune forme di realizzazione, la composizione è adatta per la somministrazione topica. Nel produrre le composizioni dell'invenzione, il principio attivo è tipicamente miscelato ad un eccipiente, diluito con un eccipiente o contenuto all'interno di un tale veicolante sotto forma, ad esempio, di una capsula, bustina, carta o altro contenitore. Quando l'eccipiente serve come diluente, può essere un materiale solido, semi-solido o liquido che agisce come veicolo, veicolante o mezzo per il principio attivo. Pertanto, le composizioni possono essere sotto forma di compresse, pillole, polveri, pasticche, bustine, cachet, elisir, sospensioni, emulsioni, soluzioni, sciroppi, aerosol (come solido o in un mezzo liquido), unguenti

contenenti, ad esempio, fino al 10% in peso del composto attivo, capsule di gelatina morbide e dure, supposte, soluzioni iniettabili sterili e polveri confezionate sterili.

Nel preparare una formulazione, il composto attivo può essere macinato per fornire una granulometria adeguata prima della combinazione con gli altri ingredienti. Se il composto attivo è sostanzialmente insolubile, può essere macinato in una granulometria inferiore a 200 mesh. Se il composto attivo è sostanzialmente idrosolubile, la granulometria può essere regolata mediante macinazione per fornire una distribuzione sostanzialmente uniforme nella formulazione, *ad es.*, circa 40 mesh.

I composti dell'invenzione possono essere macinati usando procedure di macinazione note quali macinazioni ad umido per ottenere una granulometria adeguata per la formulazione in compresse o per altri tipi di formulazioni. Preparazioni finemente divise (nanoparticellari) dei composti dell'invenzione possono essere preparate mediante processi noti nella tecnica, ad es., si veda la Domanda Internazionale N. WO 2002/000196.

Alcuni esempi di eccipienti adatti includono lattosio, destrosio, saccarosio, sorbitolo, mannitolo, amidi, gomma d'acacia, fosfato di calcio, alginati, gomma adragante, gelatina, silicato di calcio, cellulosa microcristallina, polivinilpirrolidone, cellulosa, acqua, sciroppo, e metilcellulosa. Le formulazioni possono in aggiunta includere: agenti lubrificanti quali talco, stearato di magnesio, e olio minerale; agenti umettanti; agenti emulsionanti e di sospensione; agenti conservanti quali metil-benzoati e propilidrossi-benzoati; agenti dolcificanti; e agenti aromatizzanti. Le composizioni dell'invenzione possono essere formulate così da fornire un rilascio rapido, sostenuto o ritardato dell'ingrediente attivo dopo somministrazione al paziente impiegando procedure note nella tecnica.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende cellulosa microcristallina silicificata (SMCC) e almeno un composto descritto nella presente o un suo sale farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, la cellulosa microcristallina silicificata comprende circa il 98% di cellulosa microcristallina e circa il 2% di biossido di silicio p/p.

In alcune forme di realizzazione, la composizione è una composizione a rilascio sostenuto comprendente almeno un composto descritto nella presente, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, e almeno un veicolante

farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende almeno un composto descritto nella presente, o un suo sale farmaceuticamente accettabile e almeno un componente selezionato tra cellulosa microcristallina, lattosio monoidrato, idrossipropilmetilcellulosa, e polietilenossido. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende almeno un composto descritto nella presente o un suo sale farmaceuticamente accettabile e cellulosa microcristallina, lattosio monoidrato, e idrossipropilmetilcellulosa. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende almeno un composto descritto nella presente o un suo sale farmaceuticamente accettabile, e cellulosa microcristallina, lattosio monoidrato, e polietilenossido. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende inoltre stearato di magnesio o biossido di silicio. In alcune forme di realizzazione, la cellulosa microcristallina è Avicel PH102™. In alcune forme di realizzazione, il lattosio monoidrato è Fast-flo316™. In alcune forme di realizzazione, l'idrossipropilmetilcellulosa è idrossipropilmetilcellulosa 2208 K4M (ad es., Methocel K4 M Premier™) e/o idrossipropilmetilcellulosa 2208 K100LV (ad es., Methocel K00LV™). In alcune forme di realizzazione, il polietilenossido è polietilenossido WSR 1105 (ad es., Polyox WSR 1105™).

In alcune forme di realizzazione, un procedimento di granulazione ad umido è usato per produrre la composizione. In alcune forme di realizzazione, un procedimento di granulazione a secco è usato per produrre la composizione.

Le composizioni possono essere formulate in una forma di dosaggio unitario, ogni dosaggio contenendo da circa 1 a circa 1.000 mg, da circa 1 mg a circa 100 mg, da 1 mg a circa 50 mg, e da circa 1 mg a 10 mg di principio attivo. Preferibilmente, il dosaggio è da circa 1 mg a circa 50 mg o da circa 1 mg a circa 10 mg di principio attivo. In alcune forme di realizzazione, ogni dosaggio contiene circa 10 mg di principio attivo. In alcune forme di realizzazione, ogni dosaggio contiene circa 50 mg di principio attivo. In alcune forme di realizzazione, ogni dosaggio contiene circa 25 mg di principio attivo. L'espressione "forme di dosaggio unitario" si riferisce a unità fisicamente discrete adeguate come dosaggi unitari per individui umani e altri mammiferi, ogni unità contenendo una quantità predeterminata di materia attiva calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato, in associazione con un eccipiente farmaceutico adeguato.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni comprendono da circa 1 a circa 1.000 mg, da circa 1 mg a circa 100 mg, da 1 mg a circa 50 mg, e da circa 1 mg a 10 mg di principio attivo. Preferibilmente, le composizioni comprendono da circa 1 mg a circa 50 mg o da circa 1 mg a circa 10 mg di principio attivo. Un esperto ordinario nella tecnica apprezzerà che ciò comprende composti o composizioni contenenti da circa 1 mg a circa 10 mg, da circa 1 mg a circa 20 mg, da circa 1 mg a circa 25 mg, da circa 1 mg a circa 50 mg del principio attivo.

Il composto attivo può essere efficace su un ampio intervallo di dosaggio ed è generalmente somministrato in una quantità terapeuticamente efficace. Si comprenderà tuttavia che la quantità del composto di fatto somministrata sarà solitamente determinata da un medico, a seconda delle circostanze rilevanti, inclusi la condizione da trattare, la via di somministrazione scelta, il composto effettivo somministrato, l'età, il peso, e la risposta del singolo paziente, la gravità dei sintomi del paziente e simili.

Per preparare composizioni solide quali compresse, il principio attivo principale è miscelato con un eccipiente farmaceutico così da formare una composizione di preformulazione solida contenente una miscela omogenea di un composto della presente invenzione. Quando si indicano queste composizioni preformulazione come omogenee, il principio attivo è tipicamente disperso uniformemente in tutta la composizione in modo tale che la composizione possa essere facilmente suddivisa in forme di dosaggio unitario ugualmente efficaci quali compresse, pillole e capsule. Questa preformulazione solida è quindi suddivisa in forme di dosaggio unitarie del tipo sopra descritto contenenti da, ad esempio, circa 0,1 a circa 1000 mg del principio attivo della presente invenzione.

Le compresse o le pillole della presente invenzione possono essere rivestite o diversamente compoundizzate per fornire una forma di dosaggio che fornisce il vantaggio di azione prolungata. Ad esempio, la compressa o la pillola possono comprendere un componente di dosaggio interno e un componente di dosaggio esterno, quest'ultimo essendo sotto forma di un involucro sopra il primo. I due componenti possono essere separati da uno strato enterico che serve per resistere alla disintegrazione nello stomaco e consentire al componente interno di passare intatto nel duodeno o di avere un rilascio ritardato. Una varietà di materiali possono essere usati come tali strati enterici o rivestimenti, tali materiali comprendendo una serie di acidi polimerici e miscele di acidi

polimerici con tali materiali quali shellac, alcol cetilico e acetato di cellulosa.

Le forme liquide in cui i composti e le composizioni della presente invenzione possono essere incorporati per la somministrazione oralmente o mediante iniezione includono soluzioni acquose, sciroppi adeguatamente aromatizzati, sospensioni acquose o oleose e emulsioni aromatizzate con oli commestibili quali, olio di semi di cotone, olio di sesamo, olio di noci di cocco o olio di arachidi, nonché elisir e veicoli farmaceutici simili.

Composizioni per inalazione o insufflazione includono soluzioni e sospensioni in solventi acquosi o organici farmaceuticamente accettabili, o loro miscele, e polveri. Le composizioni liquide o solide possono contenere eccipienti farmaceuticamente accettabili adatti come descritto *supra*. In alcune forme di realizzazione, le composizioni sono somministrate mediante la via respiratoria orale o nasale per l'effetto locale sistemico. Le composizioni possono essere nebulizzate mediante l'uso di gas inerti. Soluzioni nebulizzate possono essere respirate direttamente dal dispositivo nebulizzatore o il dispositivo nebulizzatore può essere attaccato a maschere facciali o ad una macchina di respirazione a pressione positiva intermittente. Le composizioni in soluzione, sospensione o in polvere possono essere somministrate oralmente o per via nasale da dispositivi che rilasciano la formulazione in un modo adeguato.

Le formulazioni topiche possono contenere uno o più veicolanti convenzionali. In alcune forme di realizzazione, unguenti possono contenere acqua e uno o più veicolanti idrofobi selezionati da, ad esempio, paraffina liquida, poliossietilentalchilietere, glicole propilenico, vaselina bianca e simili. Composizioni di supporto di creme possono essere a base di acqua in combinazione con glicerolo e uno o più componenti, ad es., glicerilmonostearato, PEG-glicerilmonostearato e cetilstearylalcol. I gel possono essere formulati usando isopropilalcol e acqua, adeguatamente in combinazione con altri componenti quali, ad esempio, glicerolo, idrossietilcellulosa, e simili. In alcune forme di realizzazione, le formulazioni topiche contengono almeno circa 0,1, almeno circa 0,25, almeno circa 0,5, almeno circa 1, almeno circa 2, o almeno circa 5% in peso del composto dell'invenzione. Le formulazioni topiche possono adeguatamente essere confezionate in provette di, ad esempio, 100 g, che sono opzionalmente associate ad istruzioni per il trattamento dell'indicazione selezionata, ad es., psoriasi o altra condizione cutanea.

La quantità del composto o composizione somministrata ad un paziente varierà in base a cosa viene somministrato, lo scopo della somministrazione, come la profilassi o la terapia, lo stato del paziente, la modalità di somministrazione e simili. In applicazioni terapeutiche, le composizioni possono essere somministrate a un paziente che soffre già di una malattia in una quantità sufficiente a curare o almeno parzialmente ad arrestare i sintomi della malattia e le sue complicanze. Dosi efficaci dipenderanno dalla condizione patologica che viene trattata nonché dalla valutazione del medico curante in base a molti fattori quali la gravità della malattia, l'età, il peso e la condizione generale del paziente e simili.

Le composizioni somministrate ad un paziente possono essere sotto forma delle composizioni farmaceutiche sopra descritte. Queste composizioni possono essere sterilizzate mediante tecniche di sterilizzazione tradizionali o possono essere filtrate sterili. Le soluzioni acquose possono essere confezionate per l'uso come tale o liofilizzate, la preparazione liofilizzata essendo combinata con un veicolante acquoso sterile prima della somministrazione. Il pH delle preparazioni del composto saranno tipicamente tra 3 e 11, in modo maggiormente preferibile da 5 a 9 e in modo massimamente preferibile da 7 a 8. Si comprenderà che l'uso di alcuni degli eccipienti, veicolanti o stabilizzanti precedenti risulterà nella formazione di sali farmaceutici.

Il dosaggio terapeutico di un composto della presente invenzione può variare, ad esempio, secondo il particolare uso per cui il trattamento è realizzato, la modalità di somministrazione del composto, la salute e la condizione del paziente e la valutazione del medico curante. La proporzione o la concentrazione di un composto dell'invenzione, in una composizione farmaceutica può variare a seconda di una serie di fattori inclusi dosaggio, caratteristiche chimiche (*ad es.*, idrofobicità), e la via di somministrazione. Ad esempio, i composti dell'invenzione possono essere forniti in una soluzione tampone fisiologica acquosa contenente da circa 0,1 a circa 10% p/v del composto per la somministrazione parenterale. Alcuni intervalli di dosaggio tipici sono da circa 1 µg/kg a circa 1 g/kg di peso corporeo al giorno. In alcune forme di realizzazione, l'intervallo di dosaggio è da circa 0,01 mg/kg a circa 100 mg/kg di peso corporeo al giorno. Il dosaggio dipende probabilmente da variabili quali il tipo e il livello di progressione della malattia o disturbo, lo stato di salute complessivo del particolare paziente, l'efficacia biologica relativa del composto selezionato, la formulazione dell'eccipiente e la

sua via di somministrazione. Dosi efficaci possono essere estrapolate da curve dose-risposta derivate da sistemi di test *in vitro* o di modello animale.

Le composizioni dell'invenzione possono inoltre includere uno o più agenti farmaceutici aggiuntivi quali chemioterapici, steroidi, un composto anti-infiammatorio o immunosoppressivo, esempi dei quali sono elencati qui sopra.

In alcune forme di realizzazione, il composto, o suo sale farmaceuticamente accettabile, è somministrato come composizione oftalmica. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, i metodi comprendono la somministrazione del composto, o suo sale farmaceuticamente accettabile e un veicolante oftalmicamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una composizione liquida, una composizione semi-solida, un inserto, film, microparticelle o nanoparticelle.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una composizione liquida. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una composizione semi-solida. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una composizione topica. Le composizioni topiche includono, ma senza limitazione, composizioni liquide e semi-solidi. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una composizione topica. In alcune forme di realizzazione, la composizione topica comprende una soluzione acquosa, sospensione acquosa, un unguento o un gel. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è applicata topicamente nella parte frontale dell'occhio, al di sopra della palpebra superiore, sulla palpebra inferiore e nel cul-de-sac. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è sterilizzata. La sterilizzazione può essere effettuata mediante tecniche note quali filtrazione per sterilizzazione della soluzione o mediante riscaldamento della soluzione nella fiala pronta per l'uso. Le composizioni oftalmiche dell'invenzione possono inoltre contenere eccipienti farmaceutici adeguati per la preparazione di formulazioni oftalmiche. Esempi di tali eccipienti sono agenti conservanti, agenti tampone, agenti chelanti, agenti antiossidanti e sali per regolare la pressione osmotica.

Come usata nella presente, l'espressione "veicolante oftalmicamente accettabile" si riferisce a qualsiasi materiale che può contenere e rilasciare il composto, o suo sale farmaceuticamente accettabile e che è compatibile con

l'occhio. In alcune forme di realizzazione, il veicolante oftalmicamente accettabile è acqua o una soluzione o sospensione acquosa, ma include anche oli quali quelli usati per creare unguenti e matrici polimeriche come usate in inserti oculari. In alcune forme di realizzazione, la composizione può essere una sospensione acquosa comprendente il composto, o suo sale farmaceuticamente accettabile. Composizioni oftalmiche liquide inclusi sia unguenti che sospensioni, possono avere una viscosità che è adatta per la via di somministrazione selezionata. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica ha una viscosità nell'intervallo da circa 1.000 a circa 30.000 centipoise.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni oftalmiche possono inoltre comprendere uno o più tensioattivi, adiuvanti, tamponi, antiossidanti, regolatori della tonicità, conservanti (ad es., EDTA, BAK (benzalconio cloruro), sodio clorito, sodio perborato, poliquaterium-1), addensanti o modificatori della viscosità (ad es., carbosimetilcellulosa, idrossimetilcellulosa, polivinilalcol, glicole polietilenico, glicole 400, glicole propilenico, idrossimetilcellulosa, idrossipropil-guar, acido ialuronico e idrossipropilcellulosa) e simili. Additivi nella formulazione possono includere, ma senza limitazione, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio, acido sorbico, metil paraben, propil paraben, clorexidina, olio di ricino e perborato di sodio.

Composizioni oftalmiche acquose (soluzioni o sospensioni) non contengono generalmente costituenti fisiologicamente o oftalmicamente nocivi. In alcune forme di realizzazione, si usa acqua purificata o deionizzata nella composizione. Il pH può essere regolato aggiungendo acidi, basi o tamponi di regolazione del pH fisiologicamente e oftalmicamente accettabili, entro l'intervallo da circa 5.0 a 8.5. Esempi oftalmicamente accettabili di acidi includono acetico, borico, citrico, lattico, fosforico, cloridrico e simili, e esempi di basi includono idrossido di sodio, fosfato di sodio, borato di sodio, citrato di sodio, acetato di sodio, lattato di sodio, trometamina, trisidrossimetilammino-metano e simili. Sali e tamponi includono citrato/deostio, bicarbonato di sodio, cloruro di ammonio e miscele dei suddetti acidi e delle suddette basi.

In alcune forme di realizzazione, i metodi implicano la formazione o l'alimentazione di un deposito dell'agente terapeutico in contatto con la superficie esterna dell'occhio. Un deposito si riferisce ad una fonte di agente terapeutico che non è rapidamente rimossa dalle lacrime o altro meccanismo di pulizia dell'occhio. Ciò consente

che elevate concentrazioni continue e sostenute di agente terapeutico siano presenti nel fluido sulla superficie esterna dell'occhio mediante una singola applicazione. Senza voler essere vincolati ad una teoria, si ritiene che l'assorbimento e la penetrazione possano dipendere sia dalla concentrazione del farmaco disciolto che dalla durata di contatto del tessuto esterno con il fluido contenente il farmaco. Quando il farmaco è rimosso mediante eliminazione del fluido oculare e/o assorbimento nel tessuto oculare, si fornisce più farmaco, ad es. disciolto, nel fluido oculare integrato dal deposito. Di conseguenza, l'uso di un deposito può facilitare più prontamente il carico del tessuto oculare per agenti terapeutici maggiormente insolubili. In alcune forme di realizzazione, il deposito può rimanere fino a otto ore o più. In alcune forme di realizzazione, le forme di deposito oftalmico includono, ma senza limitazione, sospensioni polimeriche acquose, unguenti e inserti solidi.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è un unguento o un gel. In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è un veicolo di rilascio a base di olio. In alcune forme di realizzazione, la composizione comprende una base di petrolio o lanolina che è addizionata al principio attivo, solitamente dallo 0,1 al 2%, e eccipienti. Basi comuni possono includere, ma senza limitazione, olio minerale, vaselina e loro combinazioni. In alcune forme di realizzazione, l'unguento è applicato come nastro sulla palpebra inferiore.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è un inserto oftalmico. In alcune forme di realizzazione, l'inserto oftalmico è biologicamente inerte, morbido, bioerodibile, viscoelastico, stabile alla sterilizzazione dopo esposizione ad agenti terapeutici, resistente alle infezioni di batteri trasportati dall'aria, bioerodibile, biocompatibile, e/o viscoelastico. In alcune forme di realizzazione, l'inserto comprende una matrice oftalmicamente accettabile, ad es., una matrice polimerica. La matrice è tipicamente un polimero e l'agente terapeutico è generalmente disperso al suo interno o legato alla matrice polimerica. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico può essere lentamente rilasciato dalla matrice tramite dissoluzione o idrolisi del legame covalente. In alcune forme di realizzazione, il polimero è bioerodibile (solubile) e la sua velocità di dissoluzione può controllare la velocità di rilascio dell'agente terapeutico disperso al suo interno. In un'altra forma, la matrice polimerica è un polimero biodegradabile che si disgrega ad esempio mediante idrolisi per rilasciare in tal modo l'agente terapeutico legato ad esso o disperso al suo interno. In ulteriori forme di

realizzazione, la matrice e l'agente terapeutico possono essere circondati da un rivestimento polimerico aggiuntivo per controllare ulteriormente il rilascio. In alcune forme di realizzazione, l'inserito comprende un polimero biodegradabile quale policaprolattone (PCL), un copolimero etilene/vinilacetato (EVA), polialchilcianoacrilato, poliuretano, un nylon, o poli(di-lattide-co-glicolide) (PLGA), o un copolimero di uno qualsiasi di questi. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico è disperso nel materiale di matrice o disperso tra la composizione monomerica usata per formare il materiale di matrice prima della polimerizzazione. In alcune forme di realizzazione, la quantità di agente terapeutico è da circa 0,1 a circa 50%, o da circa 2 a circa 20%. In ulteriori forme di realizzazione, la matrice di polimero biodegradabile o bioerodibile è usata in modo tale che l'inserito esausto non debba essere rimosso. Quando il polimero biodegradabile o bioerodibile è degradato o dissolto, l'agente terapeutico viene rilasciato.

In ulteriori forme di realizzazione, l'inserito oftalmico comprende un polimero, inclusi, ma senza limitazione, quelli descritti in Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", *Asian J. Pharm.*, pagg. 12-17 (Gennaio 2008).

In alcune forme di realizzazione, l'inserito comprende un polimero selezionato tra polivinilpirrolidone (PVP), un polimero o copolimero acrilato o metacrilato (ad es., famiglia di polimeri Eudragit® della Rohm or Degussa), idrossimetilcellulosa, acido poliacrilico, dendrimeri poli(ammidoammina), poli(dimetilsilossano), polietilenossido, poli(lattide-co-glicolide), poli(2-idrossietilmetacrilato), poli(vinilalcol), o poli(propilenfumarato). In alcune forme di realizzazione, l'inserito comprende Gelfoam® R. In alcune forme di realizzazione, l'inserito è un acido poliacrilico di coniugato di cisteina da 450 kDa.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è un film oftalmico. Polimeri adeguati per tali film includono, ma senza limitazione, quelli descritti in Wagh, et al., (*ibid*). In alcune forme di realizzazione, il film è una lente a contatto morbida, quali quelle realizzate dai copolimeri di N,N-dietilacrilammide e acido metacrilico reticolato con etilenglicol dimetacrilato.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica comprende microsfeere o nanoparticelle. In alcune forme di realizzazione, le microsfeere comprendono gelatina. In alcune forme di realizzazione, le microsfeere sono

iniettate nel segmento posteriore dell'occhio, nello spazio coroidale, nella sclera, a livello intravitreo o sub-retina.

In alcune forme di realizzazione, le microsfeere o le nanoparticelle comprendono un polimero che comprende, ma senza limitazione, quelli descritti in Wagh, et al., (*ibid*), che è incorporato nella presente per riferimento nella sua interezza. In alcune forme di realizzazione, il polimero è chitosano, un acido policarbossilico quale acido poliacrilico, particelle di albumina, esteri di acido ialuronico, acido poliitaconico, poli(butil)cianoacrilato, policaprolattone, poli(isobutil)caprolattone, poli(acido lattico-acido co-glicolico), o poli(acido lattico). In alcune forme di realizzazione, le microsfeere o le nanoparticelle comprendono particelle lipidiche solide.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica comprende una resina a scambio ionico. In alcune forme di realizzazione, la resina a scambio ionico è una zeolite inorganica o una resina organica sintetica. In alcune forme di realizzazione, la resina a scambio ionico include, ma senza limitazione, quelle descritte in Wagh, et al. (*ibid*). In alcune forme di realizzazione, la resina a scambio ionico è acido poliacrilico parzialmente neutralizzato.

In alcune forme di realizzazione, la composizione oftalmica è una sospensione polimerica acquosa. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico o un agente di sospensione polimerico è sospeso in un mezzo acquoso. In alcune forme di realizzazione, le sospensioni polimeriche acquose possono essere formulate in modo tale che esse mantengano la stessa o sostanzialmente la stessa viscosità nell'occhio che avevano prima della somministrazione nell'occhio. In alcune forme di realizzazione, esse possono essere formulate in modo tale che vi sia una gelificazione aumentata in seguito a contatto con il fluido lacrimale.

Composti marcati e metodi di saggio

Un altro aspetto della presente invenzione è relativo a composti marcati dell'invenzione (radio-marcato, marcati a fluorescenza, ecc.) che sarebbero utili non soltanto in tecniche di imagingografia ma anche in saggi, sia *in vitro* che *in vivo* per la localizzazione e la quantificazione di JAK in campioni tissutali, inclusi esseri umani, e per l'identificazione di ligandi di JAK mediante inibizione del legame di un composto marcato. Di conseguenza, la presente invenzione include saggi JAK che contengono tali composti marcati.

La presente invenzione include inoltre composti marcati in modo isotopico dell'invenzione. Un composto

"marcato in modo isotopico" o "radio-marcato" è un composto dell'invenzione in cui uno o più atomi sono sostituiti o scambiati con un atomo avente una massa atomica o un numero di massa diverso dalla massa atomica o dal numero di massa che si trova tipicamente in natura (*ossia*, presente in natura). Radionuclidi adeguati che possono essere incorporati in composti della presente invenzione includono, ma senza limitazione ^3H (scritto anche come T per trizio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I e ^{131}I . Il radionuclide che è incorporato nei presenti composti radio-marcati dipenderà dall'applicazione specifica del composto radio-marcato. Ad esempio, per saggi di marcatura e competizione di JAK *in vitro*, i composti che incorporano ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S saranno generalmente massimamente utili. Per applicazioni di radio-immaginografia, ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br o ^{77}Br saranno generalmente massimamente utili.

Occorre comprendere che un "composto radio-marcato" o "marcato" è un composto che ha incorporato almeno un radionuclide. In alcune forme di realizzazione, il radionuclide è selezionato nel gruppo costituito da ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S e ^{82}Br . In alcune forme di realizzazione, il composto incorpora 1, 2, o 3 atomi di deuterio.

La presente invenzione può inoltre includere metodi di sintesi per incorporare radio-isotopi nei composti dell'invenzione. Metodi di sintesi per incorporare radio-isotopi in composti organici sono ben noti nella tecnica, e un esperto ordinario nella tecnica riconoscerà facilmente i metodi applicabili per i composti dell'invenzione.

Un composto marcato dell'invenzione può essere usato in saggi di screening per identificare/valutare composti. Ad esempio, un composto appena sintetizzato o identificato (*ossia*, composto del test) che è marcato può essere valutato per la sua capacità di legarsi a JAK monitorando la sua variazione di concentrazione quando messo a contatto con JAK, tramite rintracciamento della marcatura. Ad esempio, un composto di test (marcato) può essere valutato per la sua capacità di ridurre il legame di un altro composto che è noto legarsi a JAK (*ossia*, composto standard). Di conseguenza, la capacità di un composto di test a competere con il composto standard per il legame a JAK si correla direttamente alla sua affinità di legame. Viceversa, in alcuni altri saggi di screening, il composto standard è marcato e i composti di test non sono marcati. Di conseguenza, la concentrazione del composto standard marcato è monitorata al fine di valutare la competizione tra il composto standard e il composto di test, e la relativa affinità di legame del composto di test è pertanto verificata.

Kit

La presente invenzione include anche kit farmaceutici utili, ad esempio, nel trattamento o prevenzione di malattie o disturbi JAK-associati, quali cancro, che includono uno o più contenitori contenenti una composizione farmaceutica, comprendente una quantità terapeuticamente efficace di un composto dell'invenzione. Tali kit possono inoltre includere, se si desidera, uno o più di vari componenti di kit farmaceutici tradizionali, quali, ad esempio, contenitori con uno o più veicolanti farmaceuticamente accettabili, contenitori aggiuntivi, ecc., come sarà evidente agli esperti nella tecnica. Istruzioni, sia come inserti o come etichette, indicano le quantità dei componenti da somministrare, linee guida per la somministrazione e/o linee guida per miscelare i componenti possono anche essere inclusi nel kit.

L'invenzione sarà descritta in maggior dettaglio mediante esempi specifici. I composti degli Esempi sono risultati essere inibitori di JAK secondo almeno un saggio descritto nella presente.

ESEMPI

Procedure sperimentali per composti dell'invenzione sono fornite sotto. Esempi 14-17 sono secondo l'invenzione.

La purificazione mediante LC-MS preparativa di accesso aperto di alcuni dei composti preparati è stata eseguita su sistemi di frazionamento massa-diretto della Waters. L'impostazione dell'apparecchiatura di base, i protocolli e il software di controllo per l'operazione di questi sistemi sono stati descritti in dettaglio nella letteratura. *Si veda, ad es.*, "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, *J. Combi. Chem.*, 4, 295 (2002); "Optimizing Preparative LC-MS Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification", K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, *J. Combi. Chem.*, 5, 670 (2003); e "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, *J. Combi. Chem.*, 6, 874-883 (2004). I composti separati sono stati nuovamente sottoposti a spettrometria di massa a cromatografia liquida analitica (LCMS) per la purezza alle seguenti condizioni: Strumento: Agilent serie 1100, LC/MSD, Colonna; Waters Sunfire™ C₁₈ 5 µm, 2,1 x 5,0 mm, Tamponi: fase mobile A: 0,025% TFA in acqua e fase mobile B: 0,025% TFA in acetonitrile; gradiente dal 2% all'80% di B in

3 minuti con portata di 1,5 ml/minuto.

Alcuni dei composti preparati sono anche stati separati su una scala preparativa mediante cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC) con rivelatore MS o cromatografia flash (gel di silice) come è indicato negli esempi. Le condizioni della colonna di cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa preparativa tipica (RP-HPLC) sono le seguenti:

pH = 2 purificazioni: colonna Waters Sunfire™ C₁₈ 5µm 19 x 100 nm, eluizione con fase mobile A: 0,1% TFA (acido trifluoroacetico) in acqua e fase mobile B: acetonitrile; la portata era di 30 ml/minuto, il gradiente di separazione era ottimizzato per ogni composto usando il protocollo di Ottimizzazione dei Metodi Specifici dei Composti come descritto in letteratura [*Si veda* "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, *J. Comb. Chem.*, **6**, 874-883 (2004)]. Tipicamente, la portata usata con la colonna da 30 x 100 mm era di 60 ml/minuto.

pH = 10 purificazioni: colonna Waters XBridge C₁₈ 5 µm, 19 x 100 mm, eluizione con fase mobile A: 0,15% di NH₄OH in acqua e fase mobile B: acetonitrile; la portata era di 30 ml/minuto, il gradiente di separazione è stato ottimizzato per ogni composto usando il protocollo di Ottimizzazione dei Metodi Specifici dei Composti come descritto in letteratura [*Si veda* "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, *J. Comb. Chem.*, **6**, 874-883 (2004)]. Tipicamente, la portata usata con una colonna da 30 x 100 mm era di 60 ml/minuto.

Alcuni dei composti preparati sono stati anche analizzati tramite Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC). Le condizioni dell'apparecchiatura DSC tipica sono le seguenti:

Calorimetria a Scansione Differenziale TA Instruments, Modello Q200 con autocampionatore. Condizioni generali: 30 – 350°C a 10°C/ min; vaschette e coperchio per campione di alluminio Tzero; flusso di gas azoto a 50 ml/min.

Alcuni dei composti preparati sono anche stati analizzati tramite Analisi Termogravimetrica (TGA). Le condizioni dell'apparecchiatura TGA tipica sono le seguenti:

Analizzatore TA Instrument Thermogravimetric, Modello Q500. Le condizioni del metodo generale: rampa da

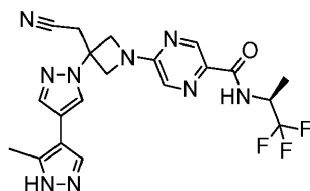
20°C a 600°C a 20°C/min; spurgo di azoto, flusso di gas a 40 ml/min seguito da equilibrio con flusso di spurgo; flusso di spurgo del campione a 60 ml/min; vaschetta per campione di platino.

Alcuni dei composti preparati sono anche stati analizzati tramite Diffrazione della Polvere a Raggi X (XRPD).

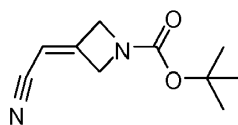
Le condizioni dell'apparecchiatura XRPD tipica sono le seguenti:

Rigaku MiniFlex X-ray Powder Diffractometer (XRPD). Procedure sperimentali generali: radiazione di raggi X da Copper a 1,054056Å con filtro K β ; la potenza dei raggi X è di 30 KV, 15 mA; la polvere di campione è dispersa su un porta campioni con sfondo zero. Condizioni di misurazioni generali: angolo di partenza – 3 gradi; angolo d'arresto – 45 gradi; campionamento – 0,02 gradi; velocità di scansione - 2 gradi/min.

Esempio 1. 5-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



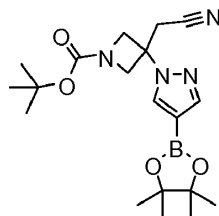
*Passaggio 1: *terz*-butil 3-(cianometilene)azetidina-1-carbossilato*



A una soluzione di potassio *terz*-butossido 1,0 M in tetraidrofurano (30,7 ml, 30,7 mmol) a 0°C è stata addizionata a gocce una soluzione di dietil cianometilfosfonato (5,20 ml, 32,2 mmol) in tetraidrofurano (39 ml). La reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e quindi raffreddata nuovamente a 0°C. Alla miscela di reazione è stata addizionata una soluzione di *terz*-butil 3-ossiazetidina-1-carbossilato (5,0 g, 0,029 mol, della Aldrich) in tetraidrofurano (8 ml). La reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente e agitata per una notte. Dopo essere stata spenta con l'acqua, la miscela è stata estratta con etilacetato (EtOAc). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, anidrificati su MgSO₄ e fatti evaporare sotto pressione ridotta. La miscela grezza è stata purificata mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0 - 70%) per fornire il prodotto desiderato (5,40 g, 95%). LCMS *calc.* per C₁₀H₁₄N₂O₂Na

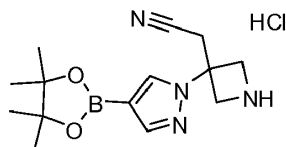
(M+Na)⁺: m/z = 217,1; trovato: 217,1

Passaggio 2: *terz-butil 3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-carbossilato*



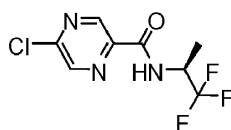
Una miscela di 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazolo (0,990 g, 5,10 mmol), *terz-butil 3-(cianometilene)azetidina-1-carbossilato* (1,00 g, 5,15 mmol) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (0,38 ml, 2,6 mmol) in acetonitrile (20 ml) è stata riscaldata a 60°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0-60%) fornendo il prodotto desiderato (1,68 g, 84,8%). LCMS *calc.* per C₁₅H₂₂BN₄O₄ (M-55)⁺: m/z = 333,2; trovato: 333,1.

Passaggio 3: *{3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-3-il}acetonitrile cloridrato*



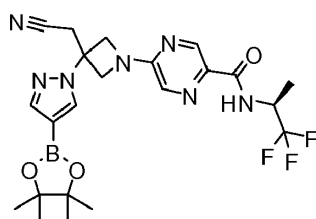
HCl 4,0 N in 1,4-diossano (2,0 ml) è stato addizionato ad una soluzione di *terz-butil 3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-carbossilato* (1,68 g, 4,33 mmol) in metilencloruro (10 ml). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte, e quindi concentrata sotto pressione ridotta fornendo il prodotto desiderato come sale HCl che è stato direttamente usato nella reazione del passaggio successivo senza ulteriore purificazione. LCMS *calc.* per C₁₄H₂₂BN₄O₂ (M+1)⁺: m/z = 289,2; trovato: 289,1.

Passaggio 4: *5-cloro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazina-2-carbossammide*



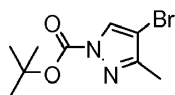
N,N-diisopropiletilammina (1,3 ml, 7,5 mmol) è stata addizionata ad una miscela di acido 5-cloropirazin-2-carbossilico (0,40 g, 2,5 mmol), *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio esafluorofosfato (1,0 g, 2,8 mmol) e (2*S*)-1,1,1-trifluoropropan-2-ammina (0,28 g, 2,5 mmol) in metilencloruro (10 ml). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata sottoposta a work up con NaHCO₃ acquoso *sat.* ed estratto con etilacetato. Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, anidrificati su MgSO₄, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice con etilacetato in esani (0-15%) per fornire il prodotto desiderato (0,47 g, 73%). LCMS *calc.* per C₈H₈ClF₃N₃O (M+1)⁺: m/z = 254,0; trovato 253,9.

*Passaggio 5: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide*



Una miscela di 5-cloro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide (254 mg, 1,0 mmol), sale {3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-3-il}acetonitrile HCl (325 mg, 1,00 mmol) e *N,N*-diisopropiletilammina (401 µl, 2,30 mmol) in 1,4-diossano (5,0 ml) è stata riscaldata a 100°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esano (gradiente: 20-80%) per fornire il prodotto desiderato. LCMS *calc.* per C₂₂H₂₈BF₃N₇O₃ (M+1)⁺: m/z = 506,2; trovato: 506,1

*Passaggio 6: terz-butil 4-bromo-3-metil-1*H*-pirazol-1-carbossilato*



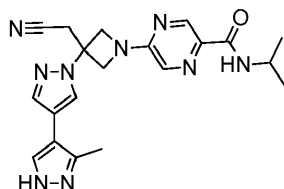
Una miscela di 4-bromo-3-metil-1*H*-pirazol (0,2 g, 1 mmol), di *terz*-butildicarbonato (0,30 g, 1,4 mmol), 4-

dimetilamminopiridina (0,02 g, 0,1 mmol) e trietilammina (0,26 ml, 1,9 mmol) in acetonitrile (2 ml) è stata agitata a t.a. per una notte. La miscela di reazione è stata concentrata e purificata mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0-15%) per fornire il prodotto desiderato (0,32 g). LCMS *calc.* per $C_5H_6BrN_2O_2$ (M-55)⁺: m/z = 205,0; trovato: 204,9

Passaggio 7: 5-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide trifluoroacetato

Una miscela di 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide (27,0 mg, 0,0533 mmol), *terz*-butil 4-bromo-3-metil-1H-pirazol-1-carbossilato (15 mg, 0,059 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (3,1 mg, 0,0027 mmol) e carbonato di sodio (17,0 mg, 0,160 mmol) in 1,4-diossano (1,6 ml) e acqua (0,8 ml) sotto azoto è stata agitata a 100°C per una notte. La miscela di reazione è stata filtrata e purificata mediante RP-HPLC (condizioni pH = 2) per fornire il prodotto desiderato come sale TFA. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.73 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 7.91 - 7.79 (m, 2H), 4.84 (m, 1H), 4.81 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 4.60 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.43 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm. LCMS *calc.* per $C_{20}H_{21}F_3N_9O$ (M+1)⁺: m/z = 460.2; Trovato: 460.0.

Esempio 2. 5-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



Passaggio 1: 5-cloro-N-isopropilpirazin-2-carbossammide

N,N-diisopropiletilammina (2,6 ml, 15 mmol) è stata addizionata ad una miscela di acido 5-cloropirazin-2-carbossilico (0,80 g, 5,0 mmol), benzotriazol-1-ilossitris(dimetilammino)fosfonio esafluorofosfato (2,46 g, 5,56 mmol) e 2-propanammina (0,47 ml, 5,6 mmol) in metilencoloro (20 ml). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata sottoposta a work up con NaHCO₃ acquoso

sat. ed estratta con etilacetato. Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, anidrificati su MgSO₄, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0-15%) per fornire il prodotto desiderato. LCMS *calc.* per C₈H₁₁ClN₃O (M+1)⁺: m/z = 200,1; trovato: 200,1.

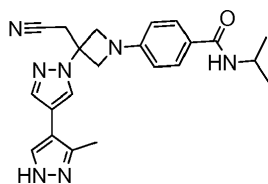
Passaggio 2: 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carbossammide

Una miscela di 5-cloro-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide (200 mg, 1,00 mmol), sale {3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*N*-pirazol-1-il]azetidina-3-il} acetonitrile HCl (325 mg, 1,00 mmol, dell'Esempio 1, passaggio 3) e *N,N*-diisopropiletilammina (401 µl, 2,30 mmol) in 1,4-diossano (5,0 ml) è stata riscaldata a 100°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata concentrata sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esano (gradiente: 20-80%) per fornire il prodotto desiderato (0,26 g, 58%). LCMS *calc.* per C₂₂H₃₁BN₇O₃ (M+1)⁺: m/z = 452,3; trovato: 452,2

Passaggio 3: 5-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato

Una miscela di *terz*-butil 4-bromo-3-metil-1*H*-pirazol-1-carbossilato (15,7 mg, 0,0600 mmol), 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide (25,8 mg, 0,0571 mmol), complesso [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) con diclorometano (1:1) (2,3 mg, 0,0028 mmol) e fosfato di potassio (0,036 g, 0,17 mmol) in diossano (0,5 ml) e acqua (0,2 ml) in una provetta di reazione è stata degassificata e sigillata. La miscela è stata riscaldata a 110°C per 3 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata diluita con metanolo, filtrata e purificata mediante RP-HPLC (condizioni pH = 2) per fornire il prodotto desiderato come sale TFA. LCMS *calc.* per C₂₀H₂₄N₉O (M+1)⁺: m/z = 406,2; trovato: 406,1

Esempio 3. 4-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilbenzammide trifluoroacetato



Passaggio 1: Etil 4-(3-idrossiazetidina-1-il)benzoato

Una miscela di etil 4-fluorobenzoato (0,841 g, 5,00 mmol, della Aldrich), azetidina-3-olo cloridrato (0,438 g, 4,00 mmol, della Aldrich) e carbonato di potassio (1,38 g, 9,98 mmol) in dimetil solfossido (4 ml) è stata riscaldata a 180°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata diluita con etilacetato (50 ml) e lavata con acqua e soluzione salina. Lo strato organico è stato anidrificato su MgSO₄, filtrato e concentrato sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice con etilacetato in esano (0-50%) per fornire il prodotto desiderato (0,643 g, 72,6%). LCMS *calc.* per C₁₂H₁₆NO₃ (M+1)⁺: m/z = 222,1; trovato: 222,1.

Passaggio 2: acido 4-(3-idrossiazetidina-1-il)benzoico

Una miscela di 1-[4-(3-idrossiazetidina-1-il)fenil]-2-metossietanone (1,33 g, 6,00 mmol) e litio idrossido monoidrato (504 mg, 12,0 mmol) in acqua (4 ml), metanolo (3 ml) e THF (6 ml) è stata agitata a 40°C per una notte. La miscela è stata neutralizzata con soluzione acquosa HCl 3N (~4 ml) a pH circa 7, estratta con etilacetato. Gli strati organici combinati sono stati anidrificati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta fornendo il prodotto grezzo (1,10 g, 94,9%) che è stato direttamente usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione. LCMS *calc.* per C₁₀H₁₂NO₃ (M+1)⁺: m/z = 194,1; trovato: 194,1.

Passaggio 3: 4-(3-idrossiazetidina-1-il)-N-isopropilbenzammide

Benzotriazol-1-ilossitris(dimetilammino)fosfonio esafluorofosfato (4,64 g, 10,5 mmol) della Aldrich) è stato aggiunto ad una miscela di acido 4-(3-idrossiazetidina-1-il)benzoico (1,93 g, 10,0 mmol), 2-propanammina (4,26 ml, 50,0 mmol) e N,N-diisopropiletilammina (3,88 g, 30,0 mmol) in diclorometilene (10 ml). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore, e diluita con diclorometano. La miscela è stata lavata con NaHCO₃ acquoso e soluzione salina, anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in

esano (gradiente: 0-50%) fornendo il prodotto desiderato (2,21 g, 94,3%). LCMS *calc.* per $C_{13}H_{19}N_2O_2$ (M+1)⁺: m/z = 235,1; trovato: 235,1.

Passaggio 4: N-isopropil-4-(3-ossoazetidina-1-il)benzammide

Ad una soluzione raffreddata (-78°C) di ossalilcloruro (1,05 ml, 12,4 mmol) in diclorometilene (20 ml) è stato addizionato a gocce dimetilsolfossido (1,71 ml, 24,1 mmol). La miscela è stata agitata a -78°C per 10 min. Quindi si è addizionata una sospensione di 4-(3-idrossiazetidina-1-il)-N-isopropilbenzammide (1,72 g, 7,34 mmol) in diclorometilene (20 ml). La miscela è stata agitata a -78°C per 1 ora e quindi si è addizionata trietilammina (7,04 ml, 50,5 mmol). La miscela è stata agitata a -78°C per ulteriori 1,5 ore. La miscela è stata lavata con NaHCO₃ *acq.* e soluzione salina, anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e concentrata sotto pressione ridotta. I precipitati sono stati lavati con etere e raccolti mediante filtrazione fornendo il prodotto desiderato (1,32 g, 77%) che è stato direttamente usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione. LCMS *calc.* per $C_{13}H_{17}N_2O_2$ (M+1)⁺: m/z = 233,1; trovato: 233,1.

Passaggio 5: 4-[3-(cianometilene)azetidina-1-il]-N-isopropilbenzammide

Ad una soluzione raffreddata (a -6 – 0°C) di potassio *terz*-butossido 1,0 M in tetraidrofurano (7,10 ml, 7,10 mmol) è stata aggiunta a gocce una soluzione di dietilcianometilfosfonato (1,20 ml, 7,43 mmol, della Aldrich) in tetraidrofurano (10 ml) in un periodo di 10 min e a -6 – 0°C. La reazione è stata riscaldata e agitata a temperatura ambiente per 1 ora. La miscela di reazione è stata raffreddata a -6°C nuovamente. Alla miscela di reazione è stata quindi addizionata una soluzione di N-isopropil-4-(3-ossoazetidina-1-il)benzammide (1,30 g, 5,60 mmol) in tetraidrofurano (10 ml) in un periodo di 10 min. Durante tale periodo la temperatura della miscela di reazione era tra -5 e 0°C. La reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente ed è stata agitata per 3 ore. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso un tampone di gel di silice e lavata con etilacetato. Il filtrato è stato concentrato, e il residuo è stato trattato con etere. I precipitati formati sono stati raccolti mediante filtrazione fornendo 0,60 g del prodotto desiderato. L'acqua madre è stata concentrata sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esano (gradiente: 30-80%) per fornire il prodotto desiderato (0,21 g). Il prodotto totale è 0,81 g (57%).¹H NMR (400

MHz, DMSO- d_6) δ 7.91 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.88 (p, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.77 - 4.67 (m, 2H), 4.62 (dt, $J = 5.1, 2.6$ Hz, 2H), 4.06 (m, 1H), 1.12 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H) ppm. LCMS *calc* per $C_{15}H_{18}N_3O$ (M+1)⁺: $m/z = 256.1$; Trovato: 256.1.

Passaggio 6: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-isopropilbenzammide

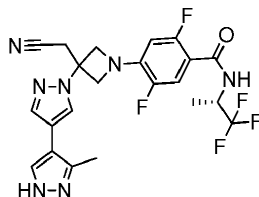
Una miscela di 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazolo (2,98 g, 15,3 mmol), 4-[3-(cianometilene)azetidina-1-il]-N-isopropilbenzammide (4,00 g, 15,7 mmol) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (1,17 g, 7,68 mmol) in isopropil alcol (10 ml) è stata riscaldata a 70°C per 1 ora. La miscela è stata raffreddata a 35°C. Alla sospensione sono stati addizionati 30 ml di metil *terz*-butiletere (MTBE), e agitato a temperatura ambiente per 1 ora. I precipitati formati sono stati raccolti mediante filtrazione, lavati con MTBE, ed anidrificati sotto pressione ridotta fornendo il prodotto desiderato (6,2 g, 89,8%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.35 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.52 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 4.05 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 1.24 (s, 12H), 1.12 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H) ppm. LCMS *calc* per $C_{24}H_{33}BN_5O_3$ (M+1)⁺: $m/z = 450.3$; Trovato: 450.3.

Passaggio 7: 4-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilbenzammide trifluoroacetato

Una miscela di *terz*-butil 4-bromo-3-metil-1H-pirazol-1-carbossilato (15,7 mg, 0,0600 mmol), 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-isopropilbenzammide (25,7 mg, 0,0571 mmol), fosfato di potassio (36,4 mg, 0,171 mmol) e complesso [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II) con diclorometano (1:1) (2,33 mg, 0,00286 mmol) in diossano (0,5 ml) e acqua (0,2 ml) in una provetta di reazione è stata degassificata e sigillata. La miscela è stata riscaldata a 110°C per 3 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata diluita con metanolo, filtrata e purificata mediante RP-HPLC (condizioni pH = 2) fornendo il prodotto desiderato come sale TFA. LCMS *calc.* per $C_{22}H_{26}N_7O$ (M+1)⁺: $m/z = 404,2$; trovato: 404,1

Esempio 4. 4-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-

trifluoro-1-metiletil]benzammide trifluoroacetato



Passaggio 1: 2,4,5-trifluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Ad una soluzione di acido 2,4,5-trifluorobenzoico (5,00 g, 28,4 mmol) in acetonitrile (50 ml) è stata addizionata *N,N*-dimetilformammide (40 μ l) seguita dall'addizione di ossalilcloruro (3,60 ml, 42,6 mmol). Dopo 90 min, le sostanze volatili sono state rimosse sotto pressione ridotte. Il residuo è stato fatto co-evaporare con acetonitrile (50 ml). Il residuo è stato quindi dissolto in metilencloruro (50 ml). Questa soluzione è stata addizionata a gocce in una miscela raffreddata (bagno di ghiaccio) di (2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-ammina cloridrato (5,52 g, 36,9 mmol) (della Synquest, 98% ee) in toluene (100 ml) e soluzione di idrossido di sodio 0,5 M acquosa (142 ml, 71,0 mmol). Dopo addizione, il bagno di ghiaccio è stato rimosso, e la reazione è stata lasciata riscaldare a t.a. La reazione è stata agitata per una notte. Lo strato organico è stato separato. Lo strato acquoso è stato estratto con metilencloruro (50 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con 20% di soluzione salina (75 ml) e acqua (2 x 75 ml), anidrificati su $MgSO_4$, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta fornendo il prodotto desiderato (6,49 g, 84%) che è stato direttamente usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.01 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.92 - 7.50 (m, 2H), 4.76 (m, 1H), 1.31 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H) ppm. LCMS *calc.* per $C_{10}H_8F_6NO$ ($M+1$) $^+$: $m/z = 272.0$; Trovato: 272.0.

Passaggio 2: 2,5-difluoro-4-(3-idrossiazetidina-1-il)-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Una miscela di 2,4,5-trifluoro-*N*-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (6,39 g, 23,6 mmol), azetidina-3-olo cloridrato (3,19 g, 28,3 mmol) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (8,81 ml, 58,9 mmol) in acetonitrile (25 ml) è stata agitata a 80°C per 2 ore. La miscela di reazione è stata diluita con EtOAc (75 ml) e lavata con HCl 1N (50 ml), $NaHCO_3$ 1N (60 ml), soluzione salina 20% (50 ml) e acqua (75 ml). Gli strati acquosi sono stati estratti con EtOAc (100 ml). Gli strati organici sono stati combinati, anidrificati su $MgSO_4$, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta fornendo il prodotto desiderato (7,59 g, 91,8%). 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.38 (dd, $J =$

8.9, 1.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 12.8, 6.5$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $J = 12.3, 7.5$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.74 (dp, $J = 15.3, 7.6$ Hz, 1H), 4.62 - 4.46 (m, 1H), 4.30 - 4.15 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 1.29 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H) ppm.

LCMS *calc.* per $C_{13}H_{14}F_5N_2O_2$ (M+1)⁺: $m/z = 325.1$; Trovato: 325.1.

Passaggio 3: 2,5-difluoro-4-(3-ossazetidina-1-il)-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Ad una soluzione di 2,5-difluoro-4-(3-idrossiazetidina-1-il)-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (7,57 g, 23,3 mmol) in metilencloruro (93 ml) è stato aggiunto iodobenzendiacetato (9,40 g, 29,2 mmol) e il radicale libero 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilossi (1,82 g, 11,7 mmol) (TEMPO) a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La miscela è stata diluita con EtOAc (100 ml), lavata con $NaHCO_3$ 0,5N (2 x 80 ml), soluzione salina 20% (100 ml) e acqua (100 ml). Gli strati acquosi sono stati estratti con etilacetato (75 ml). Gli estratti organici sono stati combinati, anidrificati su $MgSO_4$, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice eluendo con dallo 0% al 5% etilacetato in metilencloruro per fornire il prodotto grezzo che è stato ricristallizzato da MTBE (50 ml) e eptano (100 ml) per fornire il prodotto desiderato (5,44 g, 72%) come sostanza solida incolore. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 12.5, 6.5$ Hz, 1H), 6.63 (dd, $J = 12.1, 7.6$ Hz, 1H), 4.90 (d, $J = 2.1$ Hz, 4H), 4.86 - 4.68 (m, 1H), 1.31 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H) ppm. LCMS *calc.* per $C_{13}H_{12}F_5N_2O_2$ (M+1)⁺: $m/z = 323.1$; Trovato: 323.0.

Passaggio 4: 4-[3-(cianometilene)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Dietil cianometilfosfonato (1,95 ml, 11,8 mmol) è stato aggiunto a gocce ad una soluzione raffreddata (bagno di ghiaccio) di *terz*-butossido di potassio 1,0 M in THF (11,8 ml, 11,8 mmol) che è stato quindi diluito con tetraidrofurano (12 ml). Il bagno è stato rimosso e la reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente, e agitata per 90 min. La soluzione di reazione è stata raffreddata nuovamente con un bagno di ghiaccio. La suddetta soluzione preparata è stata quindi aggiunta in 12 min ad una soluzione raffreddata (bagno di ghiaccio) di 2,5-difluoro-4-(3-ossazetidina-1-il)-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (4,00 g, 12,4 mmol) in tetraidrofurano (50 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 30 min. Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte, quindi spenta mediante addizione di

20% soluzione salina (75 ml) e etilacetato (75 ml). Lo strato organico è stato separato. Lo strato acquoso è stato estratto con etilacetato (50 ml). Gli strati organici combinati sono stati anidrificati su MgSO₄, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice con etilacetato in esani (da 0% a 30%) fornendo il prodotto desiderato (2,6 g). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.59 - 8.37 (m, 1H), 7.33 (dd, *J* = 12.5, 6.4 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 12.0, 7.4 Hz, 1H), 5.88 (m, 1H), 4.94 - 4.75 (m, 4H), 4.76 (m, 1H), 1.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H) ppm. LCMS *calc.* per C₁₅H₁₃F₅N₃O (M+1)⁺: m/z = 346.1; Trovato: 346.1.

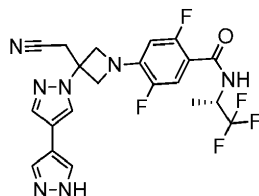
Passaggio 5: 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Una miscela di 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazole (1,00 g, 5,15 mmol), 4-[3-(cianometilene)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (1,78 g, 5,15 mmol) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (0,31 ml, 2,1 mmol) in acetonitrile (20,2 ml) è stata riscaldata a 50°C per una notte. Dopo raffreddamento, il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo è stato usato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione. LCMS *calc.* per C₂₄H₂₈BF₅N₅O₃ (M+1)⁺: m/z = 540,2; trovato: 540,1.

Passaggio 6: 4-[3-(cianometil)-3-(3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammidetrifluoroacetato

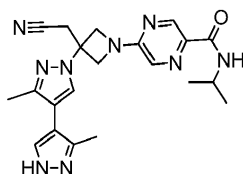
Una miscela di 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (28,8 mg, 0,0533 mmol), *terz*-butil 4-bromo-5-metil-1H-pirazol-1-carbossilato (15 mg, 0,059 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (3,1 mg, 0,0027 mmol) e sodio carbonato (17,0 mg, 0,160 mmol) in 1,4-diossano (1,6 ml) e acqua (0,8 ml) sotto azoto è stata agitata a 100°C per una notte. La miscela di reazione è stata estratta con etilacetato. Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, anidrificati su MgSO₄, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante RP-HPLC (condizioni pH = 2) per fornire il prodotto desiderato come sale TFA. LCMS *calc.* per C₂₂H₂₁F₅N₇O (M+1)⁺: m/z = 494,2; trovato: 494,0

Esempio 5. 4-[3-(1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)-3-(cianometil)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide trifluoroacetato



Questo composto è stato preparato usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 4, Passaggio 6 a partire da 4-bromo-1*H*-pirazolo e 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide. LCMS *calc.* per C₂₁H₁₉F₅N₇O (M+1)⁺: m/z = 480,2; trovato: 480,0.

Esempio 6. 5-[3-(cianometil)-3-(3,3'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



*Passaggio 1: terz-butil 3-(cianometil)-3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-carbossilato*

Una miscela di 3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazolo (1,06 g, 5,10 mmol), *terz*-butil 3-(cianometilene)azetidina-1-carbossilato (1,00 g, 5,15 mmol) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (0,38 ml, 2,6 mmol) in acetonitrile (20 ml) è stata riscaldata a 60°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0-60%) per fornire il prodotto desiderato. LCMS *calc.* per C₁₆H₂₄BN₄O₄ (M-55)⁺: m/z = 347,2; trovato: 347,1.

*Passaggio 2: {3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-3-il}acetonitrile cloridrato*

HCl 4,0 N in diossano (3 ml) è stato aggiunto ad una soluzione di *terz*-butil 3-(cianometil)-3-[3-metil-4-

(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-carbossilato in metilencloruro (10 ml). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La miscela è stata concentrata sotto pressione ridotta fornendo il prodotto grezzo come sale HCl. LCMS *calc.* per C₁₅H₂₄BN₄O₂ (M+1)⁺: m/z = 303,2; trovato: 303,1.

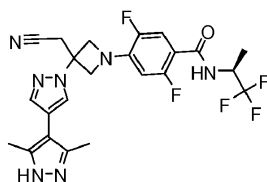
*Passaggio 3: 5-{3-(cianometil)-3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide*

Una miscela di sale {3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-3-il}acetoneitrile HCl (0,43 g, 1,3 mmol), 5-cloro-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide (0,24 g, 1,2 mmol) e *N,N*-diisopropiletilammina (0,63 ml, 3,6 mmol) in *tert*-butil alcol (12 ml, 120 mmol) è stata riscaldata a 100°C per 4 ore. Dopo raffreddamento, il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su una colonna di gel di silice eluendo con etilacetato in esani (0-60%) fornendo il prodotto desiderato. LCMS *calc.* per C₂₃H₃₃BN₇O₃ (M+1)⁺: m/z = 466,3; trovato: 466,2.

*Passaggio 4: 5-[3-(cianometil)-3-(3,3'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato*

Questo composto è stato preparato usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 4, Passaggio 6 a partire da 4-bromo-3-metil-1*H*-pirazolo e 5-{3-(cianometil)-3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-*N*-isopropilpirazin-2-carbossammide. LCMS *calc.* per C₂₁H₂₆N₉O (M+1)⁺: m/z = 420,2; trovato: 420,1.

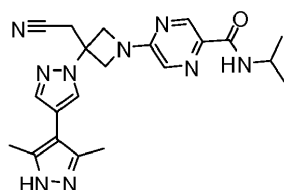
Esempio 7. 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide



Una miscela di 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (329 mg, 0,610 mmol, dell'Esempio 4, passaggio

5), 4-bromo-3,5-dimetil-1*H*-pirazolo (206 mg, 1,18 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (110 mg, 0,098 mmol) e carbonato di sodio (320 mg, 3,0 mmol) in 1,4-diossano (10 ml)/acqua (5 ml) è stata purificata con azoto e agitata a 110°C per 1 ora. La miscela di reazione è stata diluita con EtOAc, lavata con acqua e soluzione salina, concentrata. Il residuo è stato purificato dapprima con gel di silice (eluendo con 0-100% EtOAc/esani e successivamente con 10% metanolo/diclorometano), e quindi mediante prep-LCMS (colonna XBridge C18, eluendo con un gradiente di acetonitrile/acqua contenente 0,1% di idrossido di ammonio, ad una portata di 60 ml/min) per fornire il prodotto desiderato (30 mg, 9,7%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.17 (1H, s), 8.45 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.10 (1H, s), 7.70 (1H, s), 7.34 (1H, m), 6.61 (1H, s), 4.77 (1H, m), 4.62 (2H, d, *J* = 9.0 Hz), 4.39 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 3.64 (2H, s), 2.22 (6H, s), 1.31 (6H, d, *J* = 7.0 Hz) ppm. LCMS calcolato per C₂₃H₂₃F₅N₇O (M+H)⁺: m/z = 508.2; Trovato: 508.0.

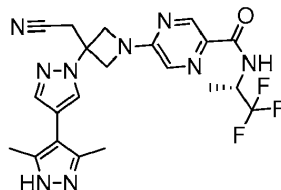
Esempio 8. 5-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-*N*-isopropilpirazina-2-carbossammide



Una miscela di 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-*N*-isopropilpirazina-2-carbossammide (256 mg, 0,567 mmol dell'Esempio 2, passaggio 2), 4-bromo-3,5-dimetil-1*H*-pirazolo (119 mg, 0,681 mmol), dicioesil(2',4',6'-triisopropilbifenil-2-il)fosfina-(2'-amminobifenil-2-il)(cloro)palladio (1:1) (67 mg, 0,085 mmol) e carbonato di cesio (550 mg, 1,7 mmol) in 1,4-diossano (2 ml)/acqua (1ml) è stata purificata con azoto tre volte. La reazione è stata riscaldata a 53°C per 2 ore. La miscela è stata diluita con EtOAc, lavata con soluzione salina, concentrata. Il residuo risultante è stato purificato dapprima su gel di silice (eluendo con 0-100% EtOAc/esani e successivamente con 10% metanolo/diclorometano), e quindi mediante prep-LCMS (colonna XBridge C18, eluendo con un gradiente di acetonitrile/acqua contenente 0,1% di idrossido di ammonio, alla portata di 60 ml/min) fornendo il prodotto desiderato (0,1 g, 40%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.12(1H, s), 8.06 (1H, d, *J*=

8.0 Hz), 7.96 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.71 (1H, s), 4.72 (2H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.49 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.08 (1H, m), 3.68 (2H, s), 2.22 (6H, s), 1.16 (6H, d, $J = 6.5$ Hz) ppm. LCMS calcolato per $C_{21}H_{26}N_9O$ ($M+H$)⁺: $m/z = 420.2$; trovato: 420.0.

Esempio 9. 5-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



Passaggio 1. [3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-3-il]acetonitrile cloridrato

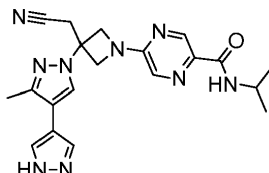
Una miscela di *terz*-butil 3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-carbossilato (381 mg, 0,981 mmol, dell'Esempio 1, passaggio 2), 4-bromo-3,5-dimetil-1H-pirazolo (206 mg, 1,18 mmol), tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (110 mg, 0,098 mmol) e carbonato di sodio (310 mg, 2,9 mmol) in 1,4 diossano (10 ml) e acqua (5 ml) è stata purificata con N_2 e agitata a 110°C per 2 ore. La miscela di reazione è stata filtrata, diluita con EtOAc, quindi lavata con acqua. Lo strato organico è stato concentrato e purificato su gel di silice (eluendo con 0-100% EtOAc/esani e successivamente con 0-10% di MeOH/diclorometano) fornendo *terz*-butil 3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-carbossilato (90 mg, 26%). LCMS calcolato per $C_{18}H_{25}N_6O_2$ ($M+1$)⁺: $m/z = 357,2$; trovato: 357,2. L'intermedio è stato trattato con cloruro di idrogeno 4,0 M in diossano (1,2 ml, 4,9 mmol) in metilencoloro (1 ml) a t.a. per 2 ore. La miscela è stata sottoposta a strippaggio fino ad essiccazione per fornire il prodotto desiderato. LCMS calcolato per $C_{13}H_{17}N_6$ ($M+1$)⁺: $m/z = 257,1$;

Passaggio 2. 5-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide trifluoroacetato

Una miscela di [3-(3',5'-dimetil-1H-1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-3-il]acetonitrile cloridrato (13 mg, 0,039 mmol), 5-cloro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide (11 mg, 0,043 mmol, dell'Esempio 1, passaggio 4) e *N,N*-diisopropiletilammina (28 μ l, 0,16 mmol) in *terz*-butil alcol (1 ml) è stata riscaldata a

100°C per 2 ore. Dopo raffreddamento, la miscela è stata eluita con MeOH e purificata su prep-LCMS (condizioni pH = 2) fornendo il prodotto desiderato come sale TFA (4,1 mg, 22%). LCMS calcolato per $C_{21}H_{23}F_3N_9O$ (M+1)⁺: m/z = 474,2; trovato: 474,0

Esempio 10. 5-[3-(cianometil)-3-(3-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



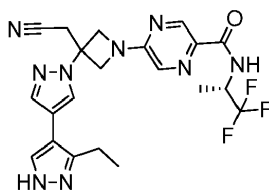
*Passaggio 1: *terz*-butil 4-bromo-1H-pirazolo-1-carbossilato*

Questo composto è stato preparato usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 1, Passaggio 6 a partire da 4-bromo-1H-pirazolo. LCMS calcolato per $C_4H_4BrN_2O_2$ (M-55)⁺: m/z = 191,0; trovato: 190,9

Passaggio 2: 5-[3-(cianometil)-3-(3-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-isopropilpirazin-2-carbossammide trifluoroacetato

Questo composto è stato preparato come sale TFA usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 4, passaggio 6 a partire da *terz*-butil 4-bromo-1H-pirazolo-1-carbossilato e 5-{3-(cianometil)-3-[3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-isopropilpirazin-2-carbossammide. LCMS calcolato per $C_{20}H_{24}N_9O$ (M+1)⁺: m/z = 406,2; trovato: 406,1.

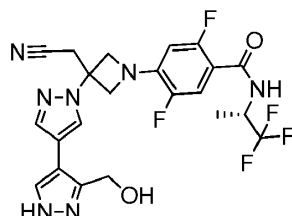
Esempio 11. 5-[3-(cianometil)-3-(3'-etil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide trifluoroacetato



Questo composto è stato preparato come sale TFA usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 4, Passaggio 6 a partire da 5-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-

pirazol-1-il]azetidina-1-il}-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]pirazin-2-carbossammide (Esempio 1, Passaggio 5) e 4-bromo-3-etil-1H-pirazolo. LCMS calcolato per $C_{21}H_{23}F_3N_9O$ (M+1)⁺: m/z = 474,2; trovato: 474,0

Esempio 12. 4-{3-(cianometil)-3-[3'-(idrossimetil)-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide trifluoroacetato



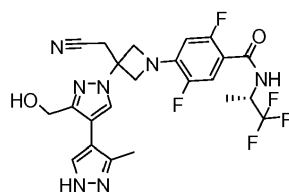
Passaggio 1: (4-bromo-1H-pirazol-5-il)metanolo

Sodio tetraidroborato (0,13 g, 3,4 mmol) è stato addizionato ad una soluzione di 4-bromo-1H-pirazol-5-carbaldeide (0,30 g, 1,7 mmol, della Maybridge) in tetraidrofurano (5 ml). La miscela di reazione è stata agitata a 50°C per 1 ora. La miscela di reazione è stata spenta con $NaHCO_3$ acquoso saturo ed estratta con etilacetato (3 x 20 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con soluzione salina, anidrificati su $MgSO_4$, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta fornendo il prodotto grezzo che è stato usato direttamente nella reazione del passaggio successivo senza ulteriore purificazione. LCMS calcolato per $C_4H_6BrN_2O$ (M+1)⁺: m/z = 177,0; trovato: 176,9.

Passaggio 2: 4-{3-(cianometil)-3-[3'-(idrossimetil)-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide trifluoroacetato

Questo composto è stato preparato come sale TFA usando procedure analoghe a quelle descritte per la sintesi dell'Esempio 4, Passaggio 6 a partire da 4-{3-(cianometil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide e (4-bromo-1H-pirazol-3-il)metanolo. LCMS calcolato per $C_{22}H_{21}F_5N_7O_2$ (M+1)⁺: m/z = 510,2; trovato: 510,0

Esempio 13. 4-{3-(cianometil)-3-[3-(idrossimetil)-3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il]azetidina-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide



Passaggio 1. Etil 4-bromo-1-((3-(cianometil)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil)ammino)carbonil)fenil]azetid-3-il}-1H-pirazol-3-carbossilato

Ad una provetta per microonde è stato addizionato isopropil alcol (10 ml), etil 4-bromo-1H-pirazol-3-carbossilato (della ChemBridge) (788 mg, 3,60 mmol), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (48,9 µl, 0,327 mmol) e 4-[3-(cianometil) azetid-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (dell'Esempio 4, passaggio 4, 1,13 g, 3,27 mmol). La miscela di reazione è stata agitata a 80°C per 2 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, il solvente è stato rimosso *in vacuo*. Il residuo è stato purificato con cromatografia flash (eluendo con 0-35% etilacetato in esani) fornendo il prodotto desiderato come schiuma bianca. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.61 (s, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 12.5 e 6.3 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 11.9 e 7.3 Hz, 1H), 4.76 (dt, *J* = 15.5 e 7.8 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.68 (s, 2H), 1.31 (m, 6H) ppm. LCMS calcolato per C₂₁H₂₀BrF₅N₅O₃ (M+H)⁺: *m/z* = 564.1; Trovato: 563.8.

Passaggio 2. Etil 1-((3-(cianometil)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil)ammino)carbonil)fenil]azetid-3-il}-3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-3-carbossilato

Ad una provetta per microonde si sono caricati *terz*-butilalcol (1,2 ml), e acqua (1,2 ml), fluoruro di cesio (683 mg, 4,50 mmol), etil 4-bromo-1-((3-(cianometil)-1-[2,5-difluoro-4-(((1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil)ammino)carbonil)fenil]azetid-3-il}-1H-pirazol-3-carbossilato (725 mg, 1,28 mmol) e 3-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)-1H-pirazolo (401 mg, 1,93 mmol), e successivamente Pd-127 (49 mg, 0,064 mmol) (della Johnson Mathew). La miscela di reazione è stata riscaldata a 85°C per 48 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita con acqua e etilacetato. Lo strato acquoso è stato estratto con etilacetato. Lo strato organico è stato anidrificato su Na₂SO₄, concentrato. Il residuo risultante è stato purificato con cromatografia flash (eluendo con 30-100% etilacetato in esani) per fornire il prodotto desiderato

come un olio. LCMS calcolato per $C_{25}H_{25}F_5N_7O_3$ (M+1)⁺: m/z = 566,2; trovato: 566,0.

Passaggio 3. 4-[3-(cianometil)-3-[3-(idrossimetil)-3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il]azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

Ad una soluzione di etil 1-{3-(cianometil)-1-[2,5-difluoro-4-({[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]ammino} carbonil)fenil]azetidina-3-il}-3'-metil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-3-carbossilato (35 mg, 0,062 mmol) in THF (0,5 ml) è stato addizionato litio tetraidroborato in THF (0,12 ml, 0,25 mmol). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata spenta lentamente con acqua. Lo strato acquoso è stato estratto con etilacetato. Lo strato organico è stato concentrato. Il residuo risultante è stato purificato con prep-LCMS (colonna XBridge C18, eluendo con un gradiente di acetonitrile/acqua contenente 0,1% di idrossido di ammonio, a portata di 60 ml/min) fornendo il prodotto desiderato. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 - 7.68 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 6.65 (m, 1H), 6.20 (m, 1H), 4.99 - 4.89 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.45 (dd, J = 8.9 and 2.0 Hz, 2H), 3.38 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.41 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS calcolato per $C_{23}H_{23}F_5N_7O_2$ (M+H)⁺: m/z = 524,2; Trovato: 524,0.

Esempio 14. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (Procedura 1)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (24,8 mg, 0,0489 mmol) è stato addizionato etanolo (0,3 ml) e la miscela è stata agitata per formare una soluzione limpida. Acido fosforico in isopropanolo (0,064 ml, 1 M, 0,064 mmol, 1,3 eq.) è stato addizionato e la miscela è stata agitata per 2 minuti per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato agitato in modo continuo per una notte. Questa miscela è stata filtrata e il pannello di filtraggio lavato con metil *terz*-butiletere (MTBE). Il pannello di filtrato è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (26,3 mg, 88,9%). Il pattern di diffrazione delle polveri a raggi X (XRPD) è stato determinato per il sale di acido fosforico ed è mostrato in Figura 1. Un elenco dei picchi 2-teta è fornito nella Tabella 2 sotto.

Tabella 2

2-Teta	Altezza	% H
--------	---------	-----

6,848	841	64,7
8,225	135	10,4
11,778	214	16,5
12,854	378	29,1
13,577	543	41,7
14,741	157	12,1
15,967	589	45,3
16,557	1061	81,6
17,425	216	16,6
18,021	299	23
19,907	1139	87,6
20,791	1300	100
21,267	248	19,1
22,556	168	12,9
23,77	949	73
24,667	716	55,1
25,698	913	70,2
26,159	434	33,4
27,392	140	10,8
28,647	199	15,3
29,667	251	19,3
30,411	333	25,6
31,213	141	10,9
32,115	84	6,5
32,893	170	13,1

33,572	109	8,4
34,449	108	8,3
35,264	82	6,3
35,741	78	6
36,709	170	13,1
37,381	103	7,9
38,828	63	4,9
39,443	117	9
40,559	88	6,8
41,227	88	6,8
43,396	61	4,7
44,1	90	6,9

Esempio 15. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetid-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (Procedura 2)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetid-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (24,6 mg, 0,0485 mmol) è stato addizionato acetonitrile (0,3 ml) e la miscela è stata agitata per formare una soluzione limpida. Acido fosforico in isopropanolo (0,063 ml, 1M, 0,063 mmol, 1,3 eq.) è stato addizionato e la miscela è stata agitata per 2 ore per formare un impasto semi-liquido che è stato quindi agitato in modo continuo per una notte. Questa miscela è stata filtrata e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (26,27 mg, 89,5%). Il pattern XRPD è stato determinato per il sale di acido fosforico ed è mostrato in Figura 2. Un elenco dei picchi 2 teta è fornito nella Tabella 3 sotto.

Tabella 3

2-Teta	Altezza	% H
6,884	499	54,1

8,305	90	9,7
11,868	165	17,9
12,945	302	32,8
13,685	411	44,6
14,831	125	13,6
16,116	368	40
16,656	818	88,8
17,528	184	19,9
18,135	278	30,1
20,003	845	91,7
20,898	921	100
21,335	178	19,3
22,409	139	15,1
22,701	135	14,6
23,894	711	77,2
24,796	535	58,1
25,821	778	84,4
26,266	245	26,6
27,483	122	13,2
28,742	160	17,4
29,761	208	22,6
30,539	237	25,7
31,331	111	12
32,176	55	5,9
33,026	134	14,5

33,714	88	9,5
34,542	69	7,5
35,263	60	6,5
35,829	48	5,3
36,838	108	11,8
37,369	64	7
38,956	53	5,8
39,631	89	9,7
40,7	75	8,2
41,298	71	7,7
43,504	54	5,9
44,228	76	8,3

Esempio 16. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (Procedura 3)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (98,93 mg, 0,195 mmol) è stato addizionato isopropanolo (1,23 ml) e la miscela è stata agitata per formare una soluzione limpida. Acido fosforico in isopropanolo (0,273 ml, 1M, 0,273 mmol, 1,4 eq.) è stato addizionato e la miscela agitata per 1 ora a 70°C per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto è stato quindi raffreddato a temperatura ambiente e agitato per una notte. Questa miscela è stata filtrata, e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (109,1 mg, 92,4%). Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido fosforico ed è mostrato in Figura 3. Un elenco dei picchi 2-teta è fornito nella Tabella 4 sotto.

Tabella 4

2-Teta	Altezza	% H
6,856	1268	100

8,237	133	10,5
11,765	209	16,5
12,859	343	27
13,596	472	37,2
14,74	127	10
15,931	403	31,8
16,569	912	72
17,425	177	13,9
17,964	80	6,3
18,495	117	9,2
19,926	876	69
20,783	865	68,2
21,274	197	15,6
22,561	152	12
23,727	634	50
24,637	370	29,2
25,706	443	35
26,157	290	22,9
27,597	117	9,3
28,627	120	9,5
29,682	151	11,9
30,389	186	14,6
31,186	103	8,1
32,128	55	4,3
32,872	98	7,7

33,483	72	5,7
34,435	87	6,8
35,257	42	3,3
35,742	56	4,4
36,667	95	7,5
37,413	84	6,7
39,574	56	4,4
41,182	60	4,8
44,124	64	5

Esempio 17. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (Procedura 4)

Passaggio 1. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (grezzo)

Ad una soluzione limpida di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (405,0 g, 798,1 mmol) in metanolo (520,0 ml) e isopropanolo (2550,0 ml) a 50°C è stata addizionata una soluzione acquosa di acido fosforico all'85% (119,65 g, 1037,8 mmol) in isopropanolo (120,0 ml) in 18 minuti per formare un impasto semi-liquido. Il risultante impasto semi-liquido è stato agitato a 50°C per 1 ora. *n*-eptano (4050,0 ml) è stato quindi addizionato all'impasto semi-liquido in 40 min, mantenendo al contempo la temperatura interna dell'impasto semi-liquido tra 46 e 53°C. Dopo l'addizione di *n*-eptano, l'impasto semi-liquido è stato gradualmente raffreddato a temperatura ambiente e agitato a temperatura ambiente per 19 ore. Le sostanze solide sono state quindi raccolte mediante filtrazione, lavate con una miscela di isopropanolo e *n*-eptano (3:10 in volume, 2 x 700 ml) e successivamente con *n*-eptano (3 x 550 ml) e essiccate sotto vuoto a temperatura ambiente per fornire il sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico grezzo (434,6 g, resa 89,9%).

Passaggio 2. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico (purificato)

In una beuta dal fondo tondo da 22 l dotata di un meccanismo di agitazione sospeso e una termocoppia rivestita con Teflon è stato addizionato sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide fosforico del Passaggio 1 (958,3 g, 1583 mmol) e metanolo (MeOH, 9583,0 ml) a temperatura ambiente. L'impasto semi-liquido risultante è stato riscaldato a 50°C per fornire una soluzione di colore arancione chiaro, limpida. La soluzione è stata filtrata pulita, ritrasferita alla beuta da 22 l e riscaldata a riflusso per distillare il metanolo (4793 g, 6090 ml) in 70 min. Isopropanolo (7700 ml) è stato quindi addizionato alla beuta in 30 min mantenendo la temperatura della soluzione tra 50 e 65°C. Dopo l'addizione completa di isopropanolo, *n*-eptano (14400 ml) è stato addizionato a porzioni mantenendo al contempo una lieve distillazione della miscela solvente (MeOH, IPA e *n*-eptano) in 2,5 ore. Un totale di 10818 g (15000 ml) della miscela solvente sono stati distillati. L'impasto semi-liquido risultante è stato gradualmente raffreddato a temperatura ambiente, e agitato a temperatura ambiente per 17 ore. Le sostanze solide sono state raccolte mediante filtrazione, lavate con una miscela di isopropanolo e *n*-eptano (1:5 in volume, 3000 ml), successivamente con *n*-eptano (3 x 4000 ml), ed essiccata sotto vuoto a temperatura ambiente per fornire il composto del titolo come polvere cristallina biancastra (925,7 g, resa 96,6%).

Il sale dell'acido fosforico è risultato essere un sale 1:1 mediante ¹H NMR e la cristallinità è stata confermata mediante XRPD. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.35 (br. s, 4H), 8.50 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.34 (dd, *J* = 12.5, 6.4 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 12.0, 7.4 Hz, 1H), 4.86 - 4.69 (m, 1H), 4.61 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 2.21 (s, 6H), 1.30 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 156.7 (d, *J*_{CF} = 246.5 Hz), 146.9 (d, *J*_{CF} = 236.1 Hz), 141.6 (dd, *J*_{CF} = 13.0, 11.7 Hz), 140.3, 138.3, 125.8 (q, *J*_{CF} = 281.8 Hz), 125.6, 117.2, 116.4 (dd, *J*_{CF} = 22.3, 4.6 Hz), 115.1, 111.3 (dd, *J*_{CF} = 15.7, 5.8 Hz), 107.7, 102.0 (dd, *J*_{CF} = 29.5, 4.5 Hz), 62.3, 57.7, 57.7, 45.8 (q, *J*_{CF} = 30.5 Hz), 27.0, 13.3 (d, *J*_{CF} = 1.7 Hz), 11.7. C₂₃H₂₂F₅N₇O (calc. MW 507.46); LCMS: (EI) m/e 508.1 (M⁺ + H). La DSC ha mostrato un picco di fusione netto a circa 227,62°C (inizio a 224,45°C) come mostrato nella Figura 4A. Il composto del titolo ha mostrato una

perdita ponderale di 0,129% fino a 200°C come mostrato in Figura 4B. Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido fosforico ed è mostrato in Figura 4C. Un elenco dei picchi 2-teta è fornito nella Tabella 5 sotto.

Tabella 5

2-Teta	Altezza	% H
6,805	8160	100
7,278	56	0,7
8,164	230	2,8
11,065	68	0,8
11,685	1060	13
12,798	260	3,2
13,512	920	11,3
14,667	110	1,3
15,923	686	8,4
16,49	2186	26,8
17,022	2 36	2,9
17,292	111	1,4
17,991	137	1,7
18,448	703	8,6
19,827	1407	17,2
20,677	2119	26
21,236	199	2,4
22,079	275	3,4
22,421	406	5
23,592	2119	26
24,635	424	5,2

25,317	296	3,6
25,64	674	8,3
26,161	363	4,5
27,284	94	1,2
27,989	198	2,4
28,628	118	1,4
29,63	135	1,7
30,419	455	5,6
32,099	60	0,7
32,832	148	1,8
33,346	166	2
34,436	447	5,5
35,711	117	1,4
36,719	295	3,6
37,349	135	1,7
38,802	53	0,6
39,585	108	1,3
40,565	64	0,8
41,224	260	3,2
42,44	68	0,8

Esempio 18. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide cloridrico (Procedura 1)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (97,64 mg, 0,192 mmol) è stato addizionato 2-butanolo (1,2 ml) e la miscela è stata agitata per 2 min per fornire una soluzione limpida. Acido cloridrico in isopropanolo/isopropilacetato (0,29 ml, 1

M in IPA/IPAc da HCl 3,7 M in IPAc, 0,29 mmol, 1,5 eq.) è stato addizionato per fornire una soluzione limpida. Questa soluzione è stata agitata per 6 min per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato quindi agitato a temperatura ambiente per 5 ore. L'impasto semi-liquido è stato quindi filtrato e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato essiccato sotto vuoto per 12 ore a 45-50°C per fornire il sale del titolo (97,8 mg, 93,4%). La DSC ha mostrato un picco di fusione netto a circa 213,07°C (inizio a 209,22°C) come mostrato in Figura 5A. Il composto del titolo ha mostrato una perdita ponderale di 4,635% fino a circa 210°C come mostrato in Figura 5B. Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido cloridrico ed è mostrato nella Figura 5C. Un elenco dei picchi 2 teta è fornito nella Tabella 6 sotto.

Tabella 6

2-Teta	Altezza	% H
7,067	208	38
12,234	289	53
13,716	308	56,4
14,48	133	24,4
14,784	295	54
15,459	289	52,9
16,259	181	33,1
16,609	359	65,7
17,121	347	63,5
19,486	129	23,5
20,439	147	27
21,259	95	17,4
22,865	223	40,8
23,857	335	61,3
24,771	546	100

25,704	204	37,4
26,496	284	51,9
27,429	334	61,1
28,354	194	35,6
28,71	106	19,3
31,472	70	12,8
31,84	117	21,4
34,09	117	21,5
40,551	58	10,6
41,48	75	13,8
44,075	53	9,7

Esempio 19. Sale dell'acido 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide cloridrico (Procedura 2)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (52,12 mg, 0,103 mmol) è stato addizionato isopropanolo (0,5 ml) e la miscela è stata agitata per 3 min per formare una soluzione limpida. Acido cloridrico in isopropanolo/isopropilacetato (0,144 ml, 1 M in IPA/IPAc da HCl 3,7 M in IPAc, 0,144 mmol, 1,4 eq.) è stato quindi addizionato, formando una soluzione limpida. Questa soluzione limpida è stata agitata per 6-8 minuti così da formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato quindi agitato a temperatura ambiente per 5 ore. L'impasto semi-liquido è stato quindi filtrato e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (51,2 mg, 91,6%). Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido cloridrico ed è mostrato in Figura 6. Un elenco dei picchi 2 teta è fornito nella Tabella 7 sotto.

Tabella 7

2-Teta	Altezza	% H
6,967	164	47,1

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

Esempio 20. Sale dell'acido bromidrico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (54,74 mg, 0,108 mmol) è stato addizionato isopropanolo (0,6 ml) e la miscela è stata agitata per 3 min per fornire una soluzione limpida. Acido bromidrico in isopropanolo/acqua (0,151 ml, 1M IPA/acqua da 48% HBr in acqua, 0,144 mmol, 1,4 eq.) è stato addizionato, formando una soluzione limpida che è stata quindi agitata per circa 8 minuti per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato agitato a temperatura ambiente per 5 ore. L'impasto semi-liquido è stato quindi filtrato e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (53,12 mg, 83,7%). DSC ha mostrato un picco di fusione netto a circa 203,19°C (inizio a 199,26°C) come mostrato in Figura 7A. Il composto del titolo ha mostrato soltanto una lieve perdita ponderale fino a circa 100°C come mostrato in Figura 7B. Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido bromidrico ed è mostrato in Figura 7C. Un elenco dei picchi 2 teta è fornito nella Tabella 8 sotto.

Tabella 8

2-Teta	Altezza	% H
7,007	254	36,6
12,179	139	20,1
12,445	116	16,8
13,468	86	12,4
14,377	297	42,9
15,042	65	9,4
15,622	192	27,6
16,211	140	20,1
17,051	281	40,5
17,407	87	12,5

18,5	62	8,9
19,583	121	17,5
20,222	308	44,4
21,104	347	50
22,821	376	54,2
23,484	338	48,8
23,663	137	19,8
24,279	137	19,8
24,889	693	100
25,425	171	24,7
25,99	76	11
26,62	203	29,3
27,095	330	47,6
27,483	116	16,7
28,208	382	55,1
28,572	159	22,9
29,801	134	19,3
30,33	89	12,8
31,278	160	23
31,971	66	9,5
33,731	118	17,1
34,608	103	14,8
35,638	68	9,8
36,746	111	16
38,497	72	10,3

39,297	112	16,2
40,476	98	14,2
41,364	169	24,4
43,37	68	9,8
43,804	60	8,7

Esempio 21. Sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (Procedura 1)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (47 mg, 0,103 mmol) è stato addizionato isopropanolo (0,5 ml) e la miscela è stata agitata per 3 min fornendo una soluzione limpida. Acido solforico in isopropanolo (0,5 M in IPA da acido solforico al 98%, 0,051 mmol, 0,55 eq.) è stato addizionato, formando una soluzione limpida, che è stata quindi agitata per 6-8 minuti per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato quindi agitato a temperatura ambiente per 5 ore. L'impasto semi-liquido è stato quindi filtrato e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato asciugato all'aria per fornire il sale del titolo (18,84 mg, 33,6%). DSC ha mostrato due endotermie a 136,16°C e 146,97°C (inizio a 122,15°C) e endotermia netta a 259,16°C (inizio a 255,09°C) come mostrato in Figura 8A. Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido solforico ed è mostrato in Figura 8B. Un elenco di picchi 2-teta è fornito nella Tabella 9 sotto.

Tabella 9

2-Teta	Altezza	% H
3,742	151	18,4
7,322	228	27,7
9,892	93	11,3
12,57	74	9
13,642	56	6,8
14,713	341	41,4

16,307	81	9,8
17,412	60	7,3
18,978	125	15,2
19,628	823	100
20,982	73	8,9
21,256	212	25,8
22,041	66	8
24,625	691	84
25,902	66	8
26,529	123	15
27,083	174	21,1
28,18	175	21,2
30,706	91	11,1
32,369	53	6,4
34,766	96	11,6
38,298	50	6
38,663	74	9
42,485	48	5,8

Esempio 22. Sale dell'acido solforico di 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (Procedura 2)

A 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-*N*-[(1*S*)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzammide (27,91 mg, 0,055 mmol) è stato addizionato isopropanolo (0,5 ml) per formare una soluzione limpida. Acido solforico in acqua (1,0 M, 0,06 mmol, 1,09 eq.) è stato addizionato e la miscela risultante è stata agitata per formare un impasto semi-liquido. Questo impasto semi-liquido è stato riscaldato a 60°C e agitato per fornire una soluzione limpida. La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente e

agitata in modo continuo per una notte. La miscela risultante è stata filtrata e il pannello di filtraggio è stato lavato con MTBE. Il pannello di filtraggio è stato quindi essiccato per fornire il sale del titolo. Il pattern XRPD è stato determinato per il sale dell'acido solforico ed è mostrato in Figura 9. Un elenco dei picchi 2-teta è fornito nella Tabella 10 sotto.

Tabella 10

2-Teta	Altezza	% H
4,843	191	22,5
7,313	218	25,8
9,856	116	13,7
12,556	95	11,2
13,61	57	6,8
14,703	361	42,6
15,261	64	7,5
16,309	147	17,3
18,941	149	17,6
19,611	847	100
20,952	113	13,3
21,242	241	28,4
21,708	100	11,8
24,609	620	73,2
26,513	130	15,3
27,026	126	14,8
28,19	167	19,7
30,659	86	10,1
32,346	60	7

34,711	108	12,7
38,597	82	9,7
41,082	55	6,4
42,435	43	5,1

Esempio A: Saggio delle JAK chinasi *in vitro*

I composti nella presente sono stati testati per l'attività inibitoria di target JAK secondo il seguente saggio *in vitro* descritto in Park *et al.*, *Analytical Biochemistry* **1999**, 269, 94-104. I domini catalitici di JAK1 (a.a.873-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) e JAK3 (a.a. 781-1124) umane con un tag His N-terminale sono stati espressi usando baculovirus in cellule di insetto e purificati. L'attività catalitica di JAK1, JAK2 o JAK3 è stata testata misurando la fosforilazione di un peptide biotinilato. Il peptide fosforilato è stato rivelato mediante fluorescenza risolta in tempo omogeneo (HTRF). Le IC₅₀ dei composti sono state misurate per ogni chinasi nelle reazioni da 40 microL che contenevano l'enzima, ATP e peptide 500 nM in tampone Tris 50 mM (pH 7.8) con NaCl 10 mM, DTT 5 mM, e 0,1 mg/ml (0,01%) BSA. Per le misurazioni delle IC₅₀ 1 mM, una concentrazione di ATP nelle reazioni era di 1 mM. Le reazioni sono state eseguite a temperatura ambiente per 1 ora e quindi arrestate con 20 µl di EDTA a 45 mM, SA-APC 300 nM, EuPy20 6 nM in tampone di saggio (Perkin Elmer, Boston, MA). Il legame all'anticorpo marcato con Europio si è verificato per 40 minuti e il segnale HTRF è stato misurato su un lettore di piastre di fusione (Perkin Elmer, Boston, MA). Si veda la Tabella 11 per i dati associati ai composti degli esempi.

Tabella 11. I dati IC₅₀ per il saggio degli enzimi JAK (a ATP 1 mM)

Es N.	IC ₅₀ di JAK1 (nM)*	IC ₅₀ di JAK2 (nM)*	JAK2/JAK1
1	+	++++	>10
2	+	++	>10
3	+	+++	>10
4	+	++	>10
5	++	+++	>10

6	+	+++	>10
7	+	++	>10
8	+	++	>10
9	+	++	>10
10	++	+++	
11	++	+++	
12	++	+++	
13	+	+++	>10
17	+	++	>10
*300 nM o meno (+); da >300 nM a 1000 nM (++); >1000 nM (+++); >700 nM (++++)			

Esempio B: Saggi cellulari

Linee di cellule cancerose dipendenti da citochine e pertanto la trasduzione del segnale JAK/STAT, per la crescita, possono essere piastrate a 6000 cellule per pozzetto (formato di piastra da 96 pozzetti) in RPMI 1640, FBS al 10% e 1 nG/ml di citochina adeguata. I composti possono essere addizionati alle cellule in DMSO/terreni (concentrazione finale 0,2% di DMSO) e incubate per 72 ore a 37°C, CO₂ al 5%. L'effetto del composto sulla vitalità cellulare è valutato usando il saggio della vitalità cellulare CellTiter-Glo Luminescent (Promega) seguito da quantificazione TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Gli effetti potenziali fuori target dei composti sono misurati in parallelo usando una linea cellulare attivata non-JAK con la stessa lettura del saggio. Tutti gli esperimenti sono eseguiti tipicamente in duplicato.

Le suddette linee cellulari possono anche essere usate per esaminare gli effetti di composti sulla fosforilazione delle JAK chinasi o su substrati a valle potenziali quali proteina STAT, Akt, Shp2, o Erk. Questi esperimenti possono essere eseguiti successivamente ad una privazione di citochine per una notte, seguita da una breve preincubazione con il composto (2 ore o meno) e stimolazione di citochine di circa 1 ora o meno. Le proteine sono quindi estratte dalle cellule e analizzate mediante tecniche note agli esperti nella tecnica incluso Western

blot o ELISA usando anticorpi che possono differenziarsi tra proteina fosforilata e totale. Questi esperimenti possono utilizzare cellule normali o cancerose per analizzare l'attività di composti sulla biologia della sopravvivenza delle cellule tumorali o su mediatori della malattia infiammatoria. Ad esempio, per quanto riguarda l'ultima, citochine quali IL-6, IL-12, IL-23 o IFN possono essere usate per stimolare l'attivazione di JAK risultante nella fosforilazione di proteina(e) STAT e potenzialmente in profili trascrizionali (valutati mediante tecnologia array o qPCR) o la produzione e/o secrezione di proteine quali IL-17. La capacità dei composti di inibire questi effetti mediate dalle citochine può essere misurata usando tecniche comuni agli esperti nella tecnica.

I composti nella presente possono anche essere testati in modelli cellulari progettati per valutare la loro potenza e attività contro JAK mutanti, ad esempio la mutazione di JAK2V617F riscontrata in disturbi proliferativi mieloidi. Questi esperimenti spesso utilizzano cellule citochina-dipendenti di linea ematologica (*ad es.* BaF/3) in cui le JAK chinasi di tipo selvatico o mutante sono espresse in modo ectopico (James, C., *et al. Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., *et al. JBC* 280:41893-41899). I punti finali includono gli effetti dei composti sulla sopravvivenza, proliferazione cellulare e proteine JAK, STAT, Akt o Erk fosforilate.

Alcuni composti della presente possono essere valutati per la loro attività di inibizione della proliferazione di cellule T. Un tale saggio può essere considerato un secondo saggio di proliferazione attivato da citochine (*ossia* JAK) e anche un saggio semplicistico della soppressione immunitaria o inibizione dell'attivazione immunitaria. Quanto segue è una breve delineazione di come tali esperimenti possono essere eseguiti. Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono preparate da campione di sangue intero umano usando il metodo di separazione Ficoll Hypaque e cellule T (frazione 2000) possono essere ottenute da PBMC mediante elutriazione. Cellule T umane appena isolate possono essere mantenute in terreni di coltura (RPMI 1640 integrato con il 10% di siero fetale bovino, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina) ad una densità di 2×10^6 cellule/ml a 37°C per fino a 2 giorni. Per l'analisi di proliferazione di cellule stimulate da IL-2, le cellule T sono dapprima trattate con fitoemoagglutinina (PHA) ad una concentrazione finale di 10 µg/ml per 72 ore. Dopo lavaggio una volta con PBS, 6000 cellule/pozzetto sono piastrate in piastre da 96 pozzetti e trattate con composti a diverse

concentrazioni nel terreno di coltura in presenza di 100 U/ml IL-2 umana (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israele). Le piastre sono incubate a 37°C per 72 ore e l'indice di proliferazione viene valutato usando reagenti CellTiter-Glo Luminescent seguendo il protocollo indicato dal produttore (Promega; Madison, WI).

Esempio C: Efficacia anti-tumorale *in vivo*

I composti della presente possono essere valutati in modelli di xenotrapianto di tumore umano in topi immunocompromessi. Ad esempio, una variante tumorigenica della linea cellulare di INA-6 plasmacitoma può essere usata per inoculare topi SCID per via sottocutanea (Burger, R., *et al.*, *Hematol J.* 2:42-53, 2001). Gli animali che portano il tumore possono quindi essere randomizzati in gruppi di trattamento con farmaco o con veicolo e diverse dosi dei composti possono essere somministrate mediante una qualsiasi delle vie consuete inclusa infusione orale, i.p., o continua usando pompe impiantabili. La crescita del tumore è seguita nel tempo usando dei calibri. Inoltre, i campioni tumorali possono essere prelevati in qualsiasi momento dopo l'inizio del trattamento per l'analisi come sopra descritta (Esempio B) per valutare gli effetti del composto sull'attività di JAK e le vie di segnalazione a valle. Inoltre, la selettività del composto(i) può essere valutata usando modelli di tumore di xenotrapianto che sono attivati da altre chinasi note (*ad es.* Bcr-Abl) quali il modello di tumore K562.

Esempio D: Test di risposta dell'ipersensibilità ritardata da contatto cutaneo murina

I composti nella presente possono anche essere testati per la loro efficacia (nell'inibizione dei target di JAK) nel modello di test di ipersensibilità ritardata murina attivata da cellule T. La risposta da ipersensibilità del tipo ritardato da contatto cutaneo murina (DTH) è considerata un modello valido di dermatite da contatto clinica, e altri disturbi immunitari mediati da linfociti T della pelle quali psoriasi (*Immunol Today*. Gennaio 1998; 19(1):37-44). DTH murina condivide molteplici caratteristiche con la psoriasi, incluso l'infiltrato immunitario, l'aumento associato di citochine infiammatorie e la iperproliferazione di cheratinociti. Inoltre, molte classi di agenti che sono efficaci nel trattare la psoriasi in ambito clinico sono anche inibitori efficaci della risposta di DTH nei topi (*Agents Actions*, Gennaio 1993; 38(1-2):116-21).

I giorni 0 e 1, topi Balb/c sono stati sensibilizzati con un'applicazione topica, sull'addome rasato, dell'antigene 2,4,dinitro-fluorobenzene (DNFB). Il giorno 5, le orecchie sono state misurate in termini di spessore usando un

micrometro da ingegnere. Questa misurazione è registrata e usata come basale. Entrambe le orecchie degli animali sono state quindi sottoposte a challenge con un'applicazione topica di DNFB in un totale di 20 µl (10 µl sulla pinna interna e 10 µl sulla pinna esterna) ad una concentrazione di 0,2%. Da ventiquattro a settantadue ore dopo il challenge, si sono nuovamente misurate le orecchie. Il trattamento con i composti del test è somministrato per tutte le fasi sensibilizzazione challenge (dal giorno -1 al giorno 7) o prima di e per tutta la fase di challenge (solitamente il pomeriggio dal giorno 4 al giorno 7). Il trattamento dei composti del test (in concentrazioni diverse) è somministrato o sistemicamente o topicamente (applicazione topica del trattamento alle orecchie). L'efficacia dei composti del test è indicata da una riduzione del gonfiore dell'orecchio rispetto ad una situazione senza il trattamento. I composti che determinavano una riduzione del 20% o più sono stati considerati efficaci. In alcuni esperimenti, i topi sono stati sottoposti a challenge ma non sensibilizzati (controllo negativo).

L'effetto inibitorio (attivazione inibente delle vie JAK-STAT) dei composti del test può essere confermato mediante analisi immunostochimica. L'attivazione della(e) via(e) di JAK-STAT determina la formazione e la traslocazione di fattori di trascrizione funzionali. Inoltre, l'influsso di cellule immunitarie e la proliferazione aumentata di cheratinociti dovrebbe anche fornire variazioni di profilo di espressione uniche nell'orecchio che possono essere analizzate e quantificate. Sezioni di orecchie fissate in formalina e incorporate in paraffina (prelevate dopo fase di challenge nel modello DTH) sono sottoposte ad analisi immunostochimica usando un anticorpo che interagisce in modo specifico con STAT3 fosforilata (clone 58E12, Cell Signaling Technologies). Le orecchie dei topi sono trattate con i composti del test, con il veicolo o con desametasone (un trattamento clinicamente efficace per la psoriasi), o senza alcun trattamento nel modello DTH per i confronti. I composti del test e il desametasone possono produrre variazioni trascrizionali simili sia a livello qualitativo che quantitativo, e entrambi i composti del test e il desametasone possono ridurre il numero di cellule infiltranti. Entrambe la somministrazione sistemica e topica dei composti del test possono produrre effetti inibitori, *ossia*, riduzione del numero di cellule infiltranti e inibizione delle variazioni trascrizionali.

Esempio E: Attività anti-infiammatoria *in vivo*

I composti nella presente possono essere valutati in modelli di roditori o non-roditori progettati per replicare una risposta infiammatoria singola o complessa. Ad esempio, i modelli di roditore dell'artrite possono essere usati per valutare il potenziale terapeutico di composti con somministrazione preventiva o terapeutica. Questi modelli includono, ma senza limitazione, artrite indotta da collagene murina o di ratto, artrite indotta da adiuvanti di ratto, e artrite indotta da anticorpo anticollagene. Le malattie autoimmuni includono, ma senza limitazione, sclerosi multipla, diabete mellito di tipo I, uveoretinite, tiroiditi, miastenia gravis, nefropatie da immunoglobuline, miocardite, sensibilizzazione delle vie aeree (asma), lupus o colite possono anche essere usate per valutare il potenziale terapeutico dei composti nella presente. Questi modelli sono ben affermati nella comunità di ricerca e sono noti agli esperti nella tecnica (Current Protocols in Immunology, Vol 3., Coligan, J.E. et al, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. and Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

Esempio F: Modelli animali per il trattamento dell'occhio secco, dell'uveite e della congiuntivite

Agenti possono essere valutati in uno o più modelli preclinici di occhio secco noti agli esperti nella tecnica inclusi, ma senza limitazione, il modello della ghiandola lacrimale con concanavalina A di coniglio (ConA), il modello murino di scopolamina (sottocutanea o transdermica), il modello della ghiandola lacrimale murina botulinico, o qualsiasi numero di modelli autoimmuni di roditore spontanei che determinano la disfunzione della ghiandola oculare (ad es., NOD-SCID, MRL/lpr, o NZB/NZW) (Barabino et al., *Experimental Eye Research* 2004, 79, 613-621 e Schrader et al., *Developmental Ophthalmology*, Karger 2008, 41, 298-312). I punti finali di questi modelli possono includere istopatologia delle ghiandole oculari e dell'occhio (cornea, ecc.) e possibilmente il test di Schirmer classico o sue versioni modificate (Barabino et al.) che misurano la produzione lacrimale. L'attività può essere valutata somministrando tramite molteplici vie di somministrazione (ad es. sistemica o topica) che possono iniziare prima o dopo che sia presente la malattia misurabile.

Agenti possono essere valutati in uno o più modelli preclinici di uveite noti agli esperti nella tecnica. Questi includono, ma senza limitazione, modelli di uveite autoimmune sperimentale (EAU) e uveite indotta da endotossina (EIU). Esperimenti di EAU possono essere eseguiti nel coniglio, nel ratto o nel topo e possono

implicare immunizzazione passiva o attivata. Ad esempio, uno qualsiasi di una serie di antigeni retinici possono essere usati per sensibilizzare gli animali ad un immunogeno rilevante, dopodichè gli animali possono essere sottoposti a challenge a livello oculare con lo stesso antigene. Il modello EIU è più acuto e implica somministrazione locale o sistemica di lipopolisaccaride a dosi subletali. I punti finali per entrambi i modelli EIU e EAU possono includere un esame fondoscopico, istopatologia tra le altre cose. Questi modelli sono riesaminati da Smith et al. (Immunology and Cell Biology 1998, 76, 497-512).

L'attività è valutata mediante somministrazione tramite molteplici vie di somministrazione (ad es. sistemica o topica) che può iniziare prima o dopo che si presenti la malattia misurabile. Alcuni modelli sopra elencati possono anche sviluppare sclerite/episclerite, corioidite, ciclite o irite e sono pertanto utili nell'analisi dell'attività potenziale dei composti per il trattamento terapeutico di queste malattie.

Gli agenti possono anche essere valutati in uno o più modelli preclinici di congiuntivite noti agli esperti nella tecnica. Questi includono, ma senza limitazione, modelli di roditori con l'uso di cavie, ratto o topo. Modelli di cavia includono l'utilizzo di immunizzazione attiva o passiva e/o protocolli di challenge immunitario con antigeni quali ovalbumina o ambrosia (riesaminata in Groneberg, D.A., et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113). I modelli di ratto e murini sono simili nel modello generale a quelli di cavia (anche riesaminato da Groneberg). L'attività può essere valutata somministrando mediante somministrazione tramite molteplici vie di somministrazione (ad es., sistemica o topica) che possono iniziare prima di o dopo che si presenti la malattia misurabile. I punti finali per tali studi possono includere, ad esempio, l'analisi istologica, immunologica, biochimica o molecolare di tessuti oculari quali la congiuntiva.

Esempio G: Protezione *in vivo* dell'osso

I composti possono essere valutati in vari modelli preclinici di osteopenia, osteoporosi o riassorbimento osseo noti agli esperti nella tecnica. Ad esempio, roditori ovariectomizzati possono essere usati per valutare la capacità di composti ad influenzare i segni e i marker di rimodellamento e/o densità ossea (W.S.S. Jee e W. Yao, J. Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 1(3), 193-207). In alternativa, la densità e la struttura ossea possono essere valutate in roditori di controllo o trattati con il composto in modelli di osteopenia indotta da terapia (ad es.,

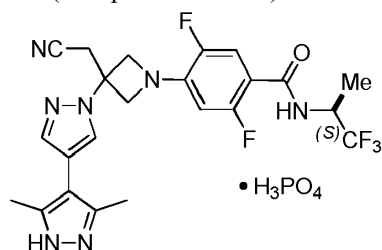
glucocorticoide) (Yao, et al., *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; e *id.* 58(11), 1674-1686). Inoltre, gli effetti dei composti sul riassorbimento e la densità ossea possono essere valutati nei modelli di roditori di artrite sopra descritti (Esempio E). I punti finali di tutti questi modelli possono variare ma includono spesso valutazioni istologiche e radiologiche nonché marker di immunohistologia e marker biochimici adeguati di rimodellamento osseo.

Esempio H: Modello di topi transgenici S100A9

È stato precedentemente mostrato che topi transgenici *S100A9* presentano accumulo nel midollo osseo di MDSC accompagnato da sviluppo di citopenia multilineare progressiva e displasia citologica simile a MDS. Inoltre, la maturazione forzata precoce di MDSC o con trattamento con acido retinoico *tutto trans* o con interruzione di proteine adattatrici (DAP12) che portano il motivo di attivazione immunorecettoriale basato su tirosina attivo (che porta ITAM) della segnalazione di CD33 ha recuperato il fenotipo ematologico e ha mitigato la malattia. Questo sistema può essere utile per testare gli effetti sull'inibizione di JAK1 nella malattia MDS-simile in un modello preclinico. *J. Clin. Invest.*, 123(11):4595-4611 (2013). Di conseguenza, un inibitore selettivo di JAK1 è somministrato mediante sondino gastrico. Viene monitorata la capacità del composto a ridurre la citopenia e la displasia citologica osservata nei topi transgenici *S100A9*.

RIVENDICAZIONI

1. Un sale che è 4-[3-(cianometil)-3-(3',5'-dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol-1-il)azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamide fosfato (Composto 1 fosfato) avente la formula:



2. Il sale della rivendicazione 1 che è un rapporto stechiometrico 1:1 di 4-[3-cianometil-3-(3',5'-dimetil-1'H-[4,4']bipirazolil-1-il)-azetidina-1-il]-2,5-difluoro-N-(2,2,2-trifluoro-1-metil-etil)-benzamide (Composto 1) e acido fosforico.
3. Il sale delle rivendicazioni 1 o 2 che è isolato.
4. Una forma solida del sale di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in cui la forma solida è cristallina.
5. La forma solida della rivendicazione 4 avente un picco XRPD, in termini di 2-teta, a 6.8 ± 0.2 gradi.
6. La forma solida della rivendicazione 4 avente almeno un picco XRPD, in termini di 2-teta, scelto tra 6.8 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , e 23.6 ± 0.2 gradi.
7. La forma solida della rivendicazione 4 avente almeno due picchi XRPD, in termini di 2-teta, scelti tra 6.8 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , e 23.6 ± 0.2 gradi.
8. La forma solida della rivendicazione 4 avente almeno tre picchi XRPD, in termini di 2-teta, scelti tra 6.8 ± 0.2 , 16.5 ± 0.2 , 20.7 ± 0.2 , e 23.6 ± 0.2 gradi.
9. La forma solida di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 avente inoltre almeno un picco XRPD, in termini di 2-teta, scelto tra 11.7 ± 0.2 , 13.5 ± 0.2 , 15.9 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , e 19.8 ± 0.2 gradi.
10. La forma solida di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 avente inoltre almeno due picchi XRPD, in termini di 2-teta, scelti tra 11.7 ± 0.2 , 13.5 ± 0.2 , 15.9 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , e 19.8 ± 0.2 gradi.
11. La forma solida di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 avente inoltre almeno tre picchi XRPD, in termini di 2-teta, scelti tra 11.7 ± 0.2 , 13.5 ± 0.2 , 15.9 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , e 19.8 ± 0.2 gradi.

12. La forma solida di una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8 avente inoltre almeno quattro picchi XRPD, in termini di 2-teta, scelti tra 11.7 ± 0.2 , 13.5 ± 0.2 , 15.9 ± 0.2 , 18.4 ± 0.2 , e 19.8 ± 0.2 gradi.

13. La forma solida di una qualsiasi delle rivendicazioni 4-12 avente un pattern XRPD come mostrato in Figura 4C.

14. La forma solida della rivendicazione 4 caratterizzata da un termogramma DSC avente un evento endotermico a $228 \pm 3^\circ\text{C}$.

15. La forma solida della rivendicazione 14 in cui l'evento endotermico ha inizio a $224 \pm 3^\circ\text{C}$.

16. La forma solida della rivendicazione 4 avente un termogramma DSC come mostrato in Figura 4A.

17. La forma solida della rivendicazione 4 avente un termogramma TGA come mostrato in Figura 4B.

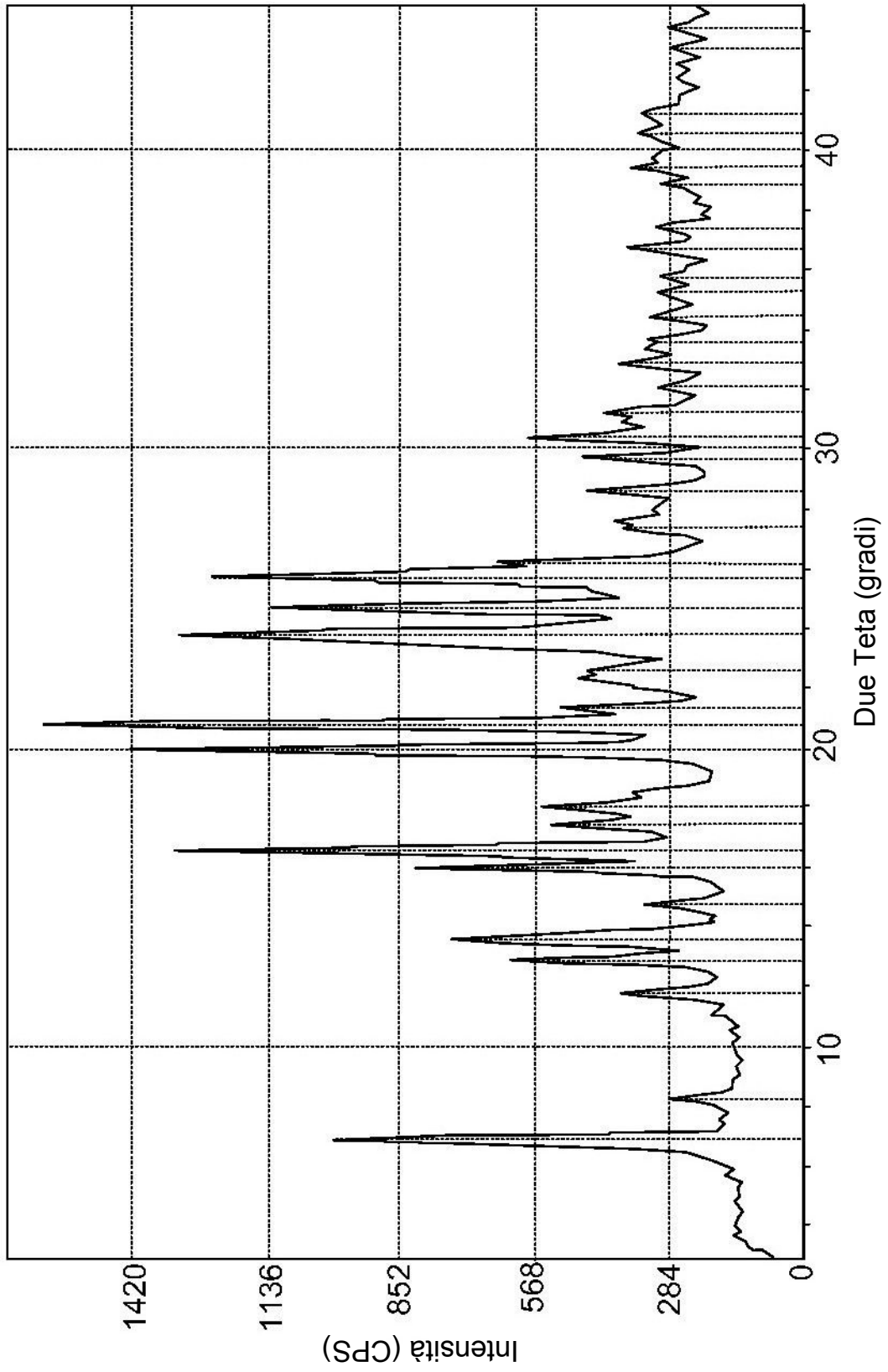


FIG. 1

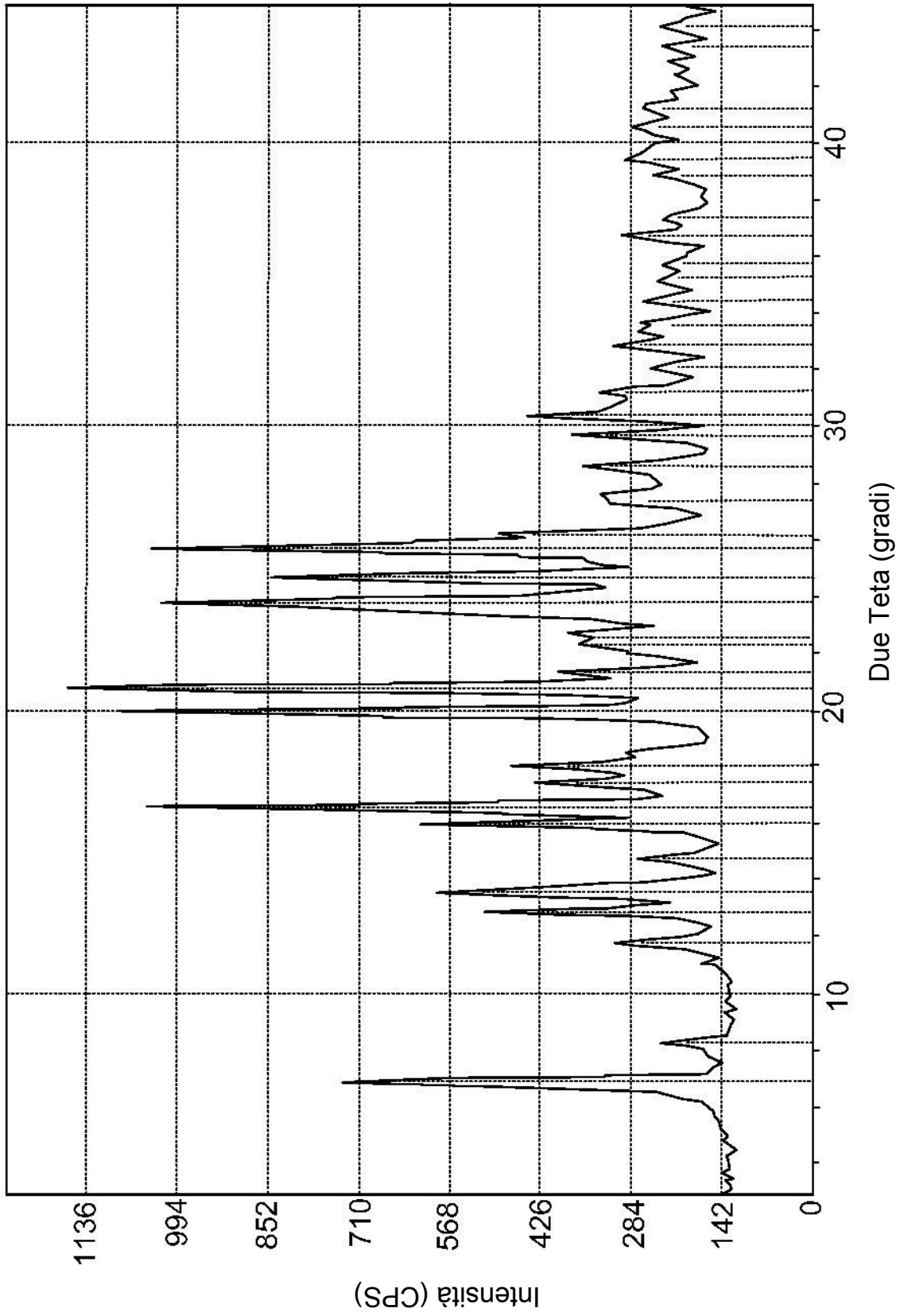


FIG. 2

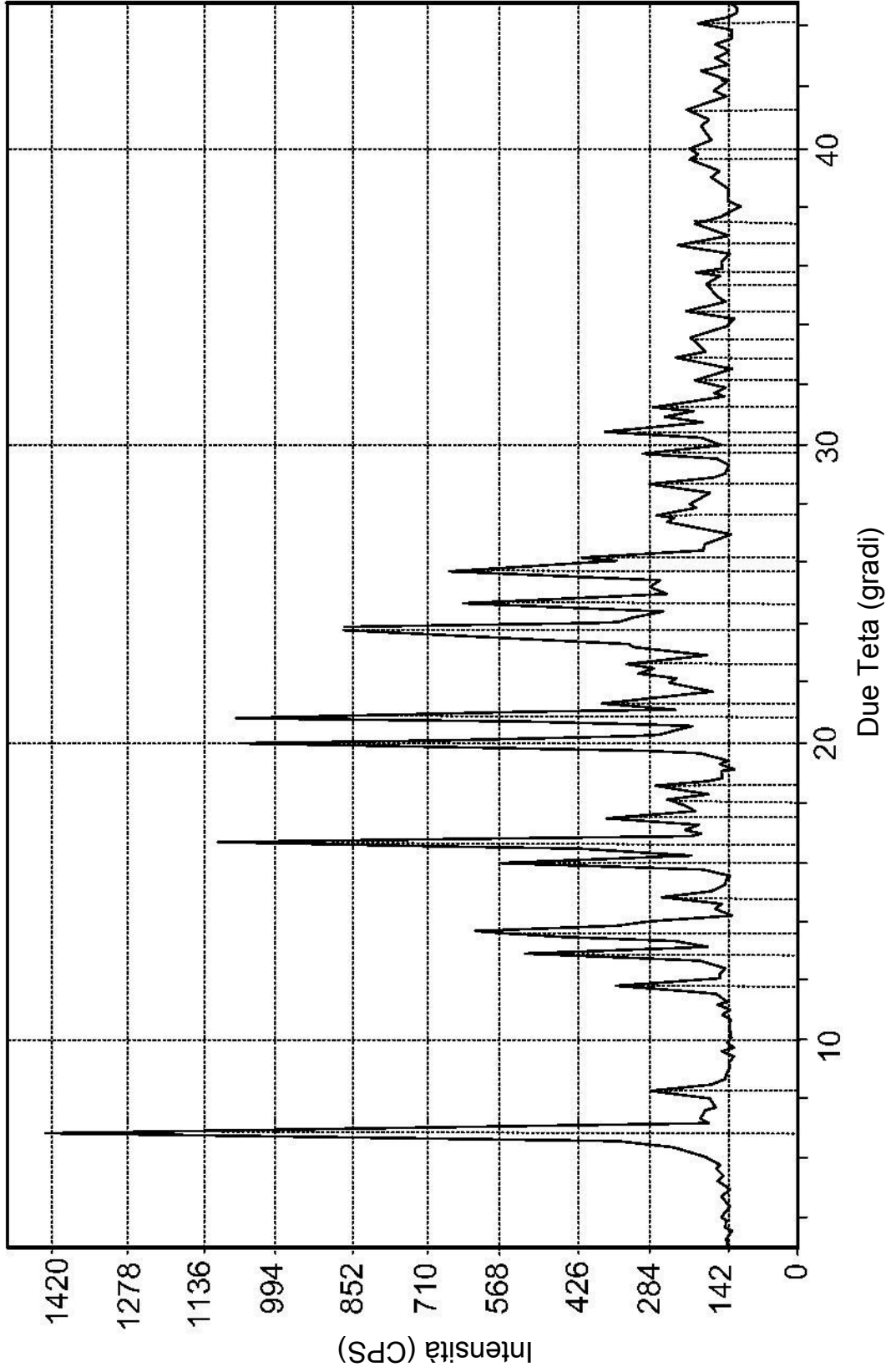
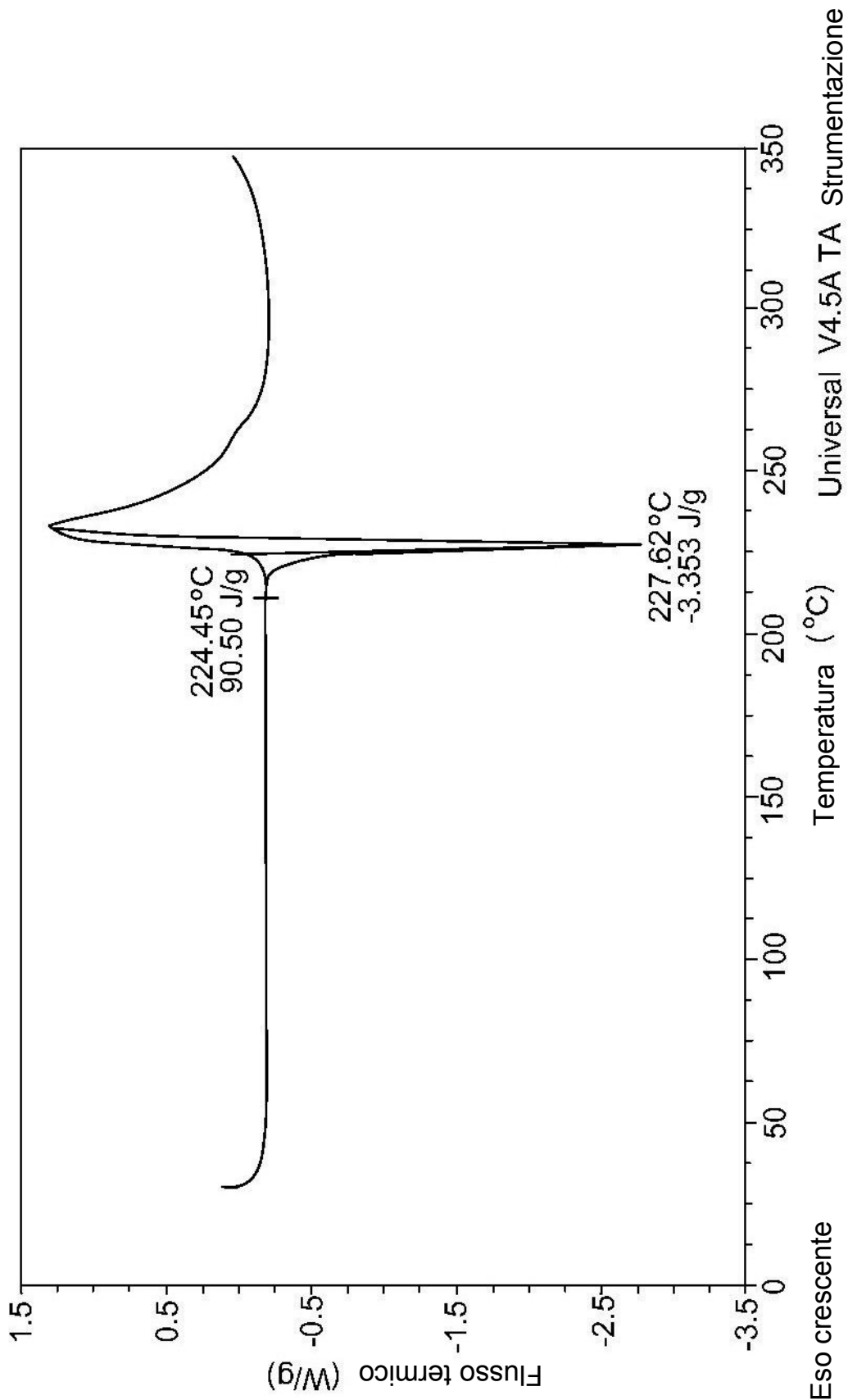
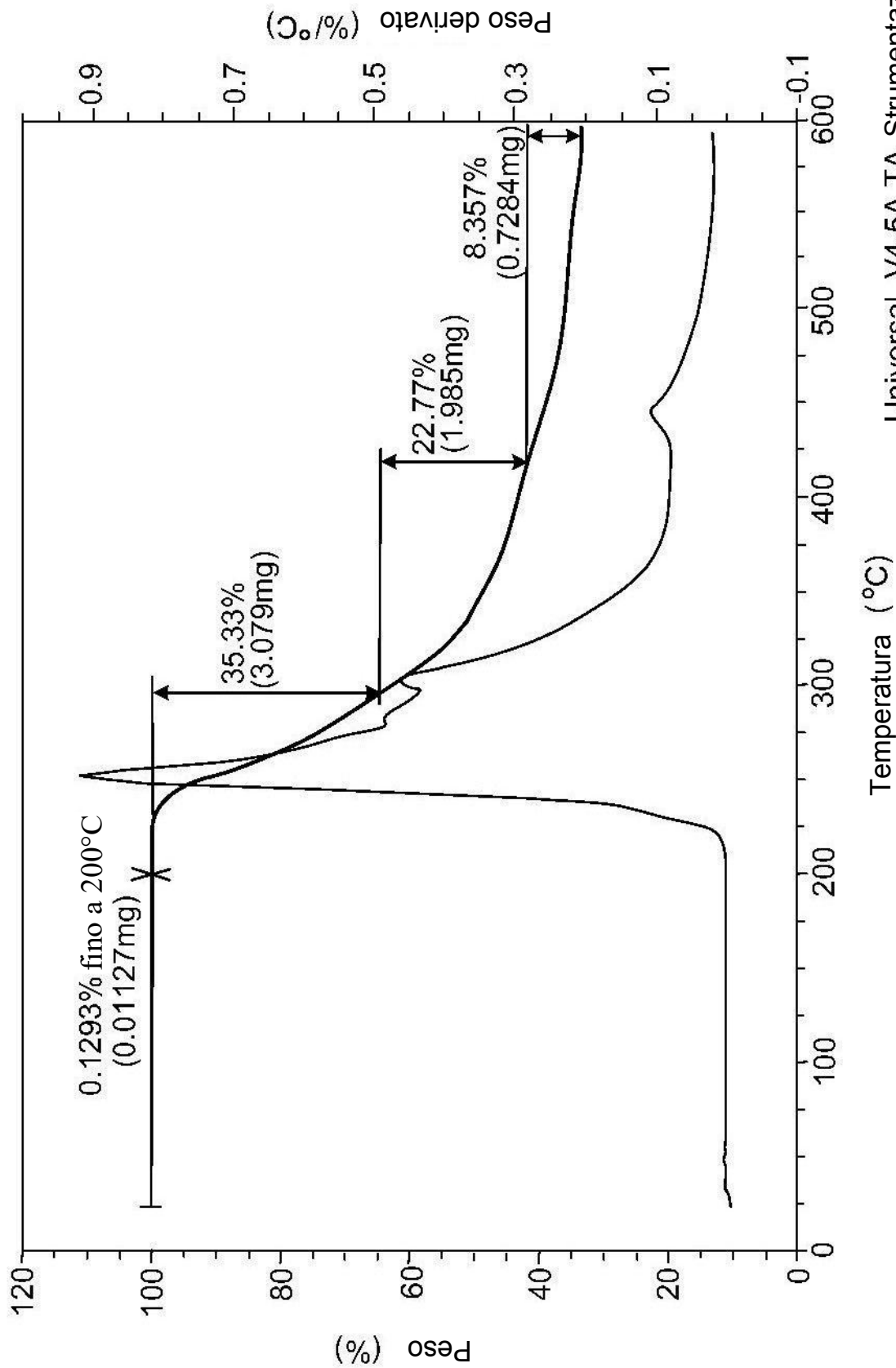


FIG. 3



Eso crescente
Temperatura (°C)
Universal V4.5A TA Strumentazione

FIG. 4A



Temperatura (°C) Universal V4.5A TA Strumentazione

FIG. 4B

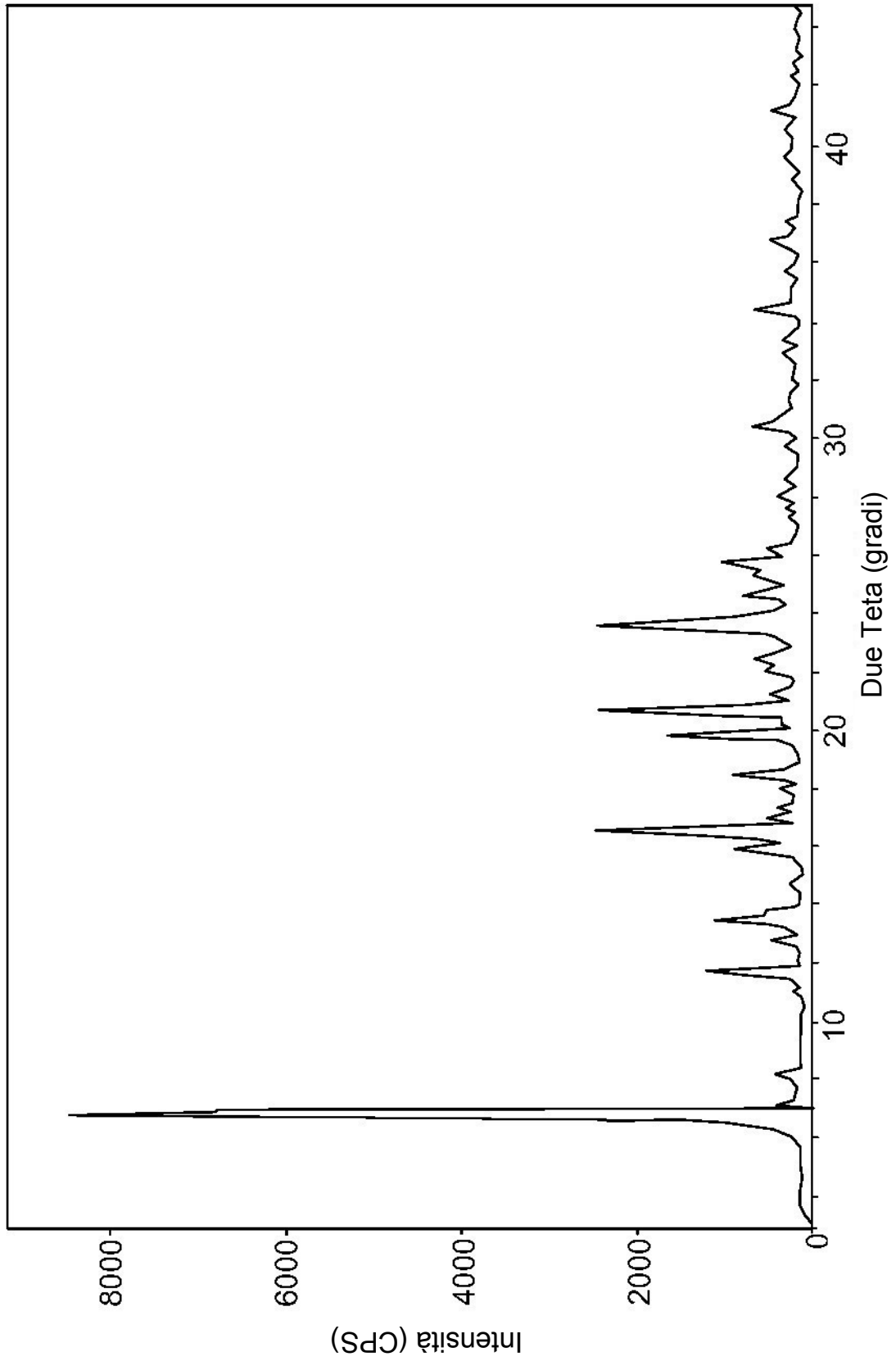
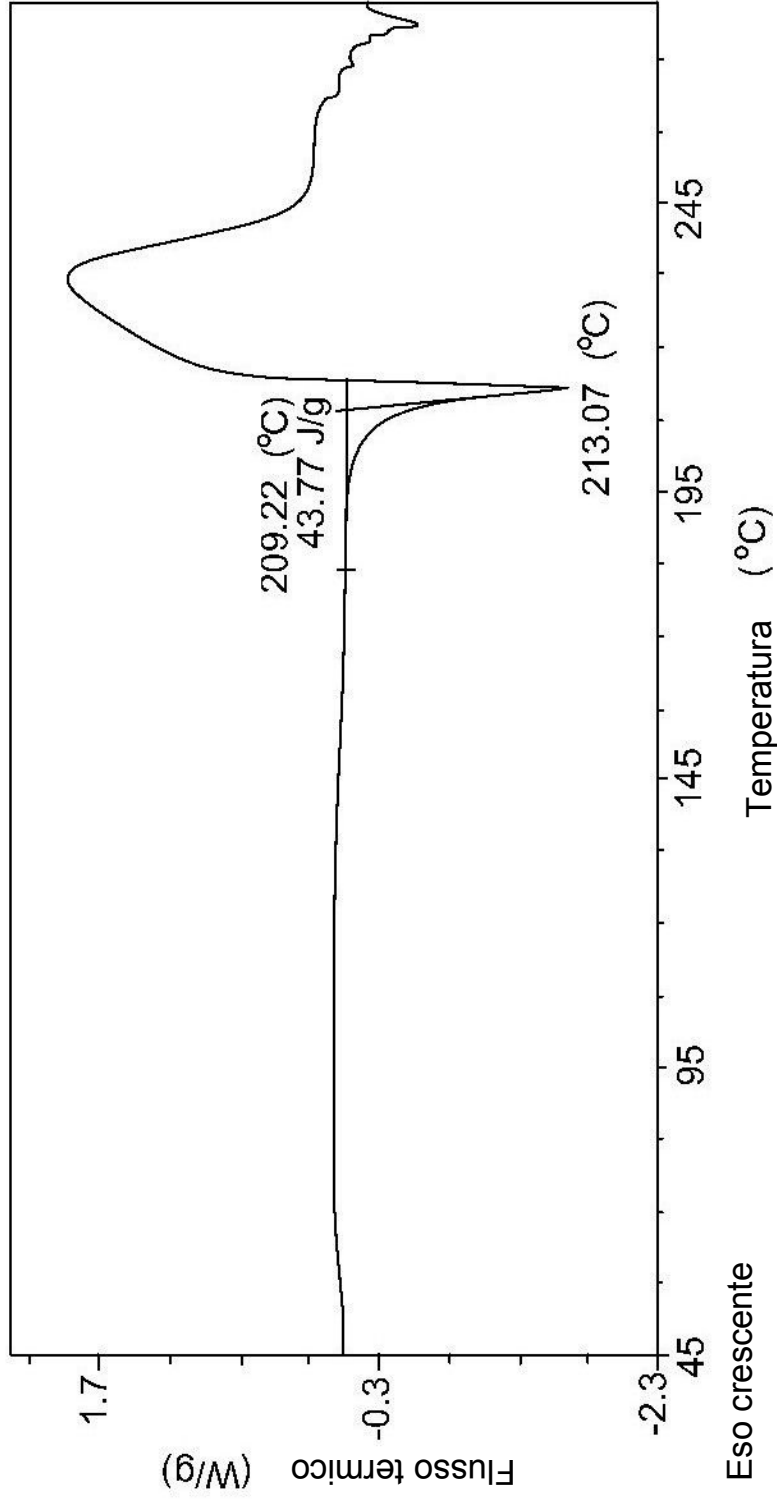
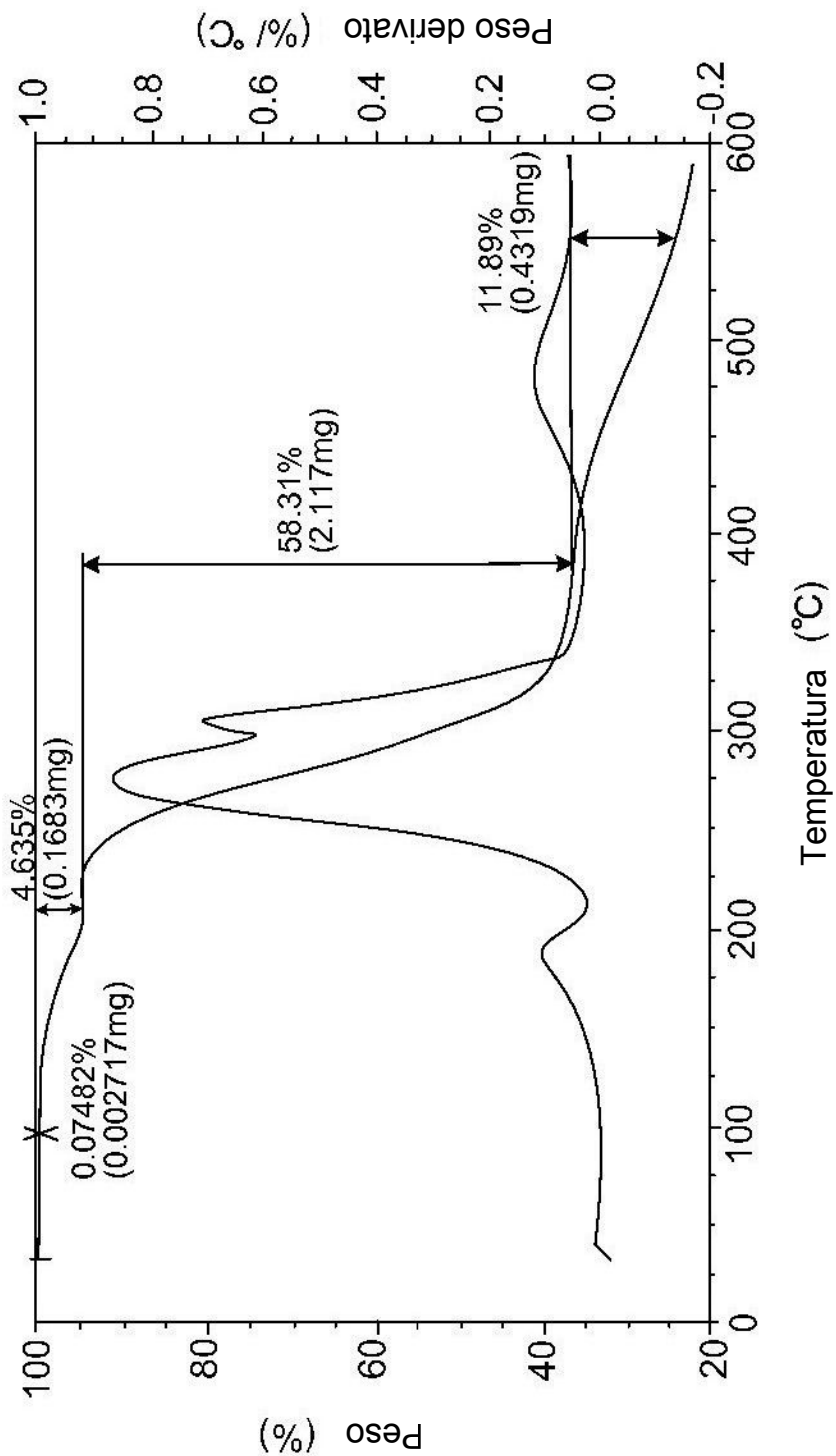


FIG. 4C



Universal V4.7A TA Strumentazione

FIG. 5A



Universal V4.5A TA Strumentazione

FIG. 5B

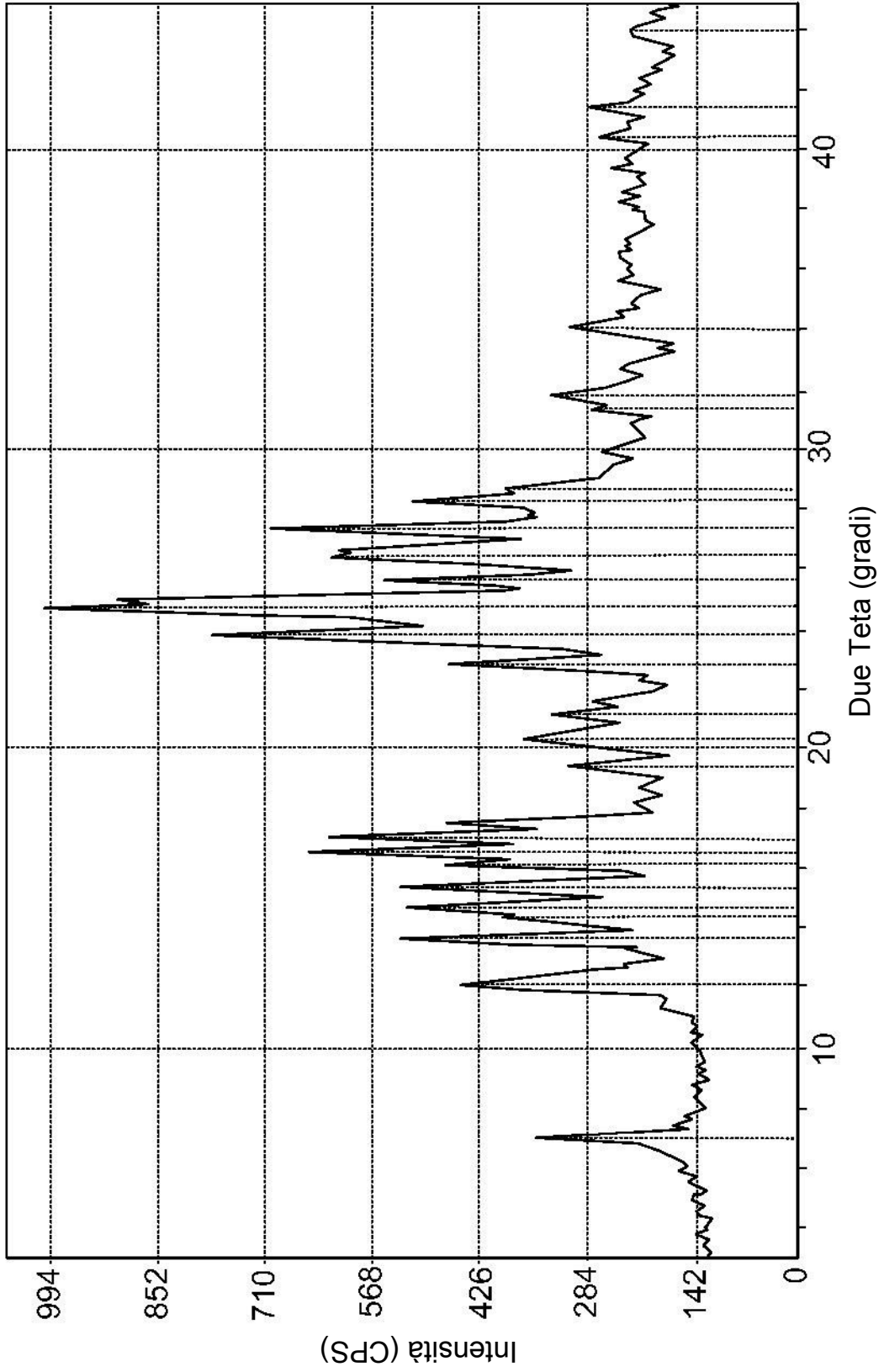


FIG. 5C

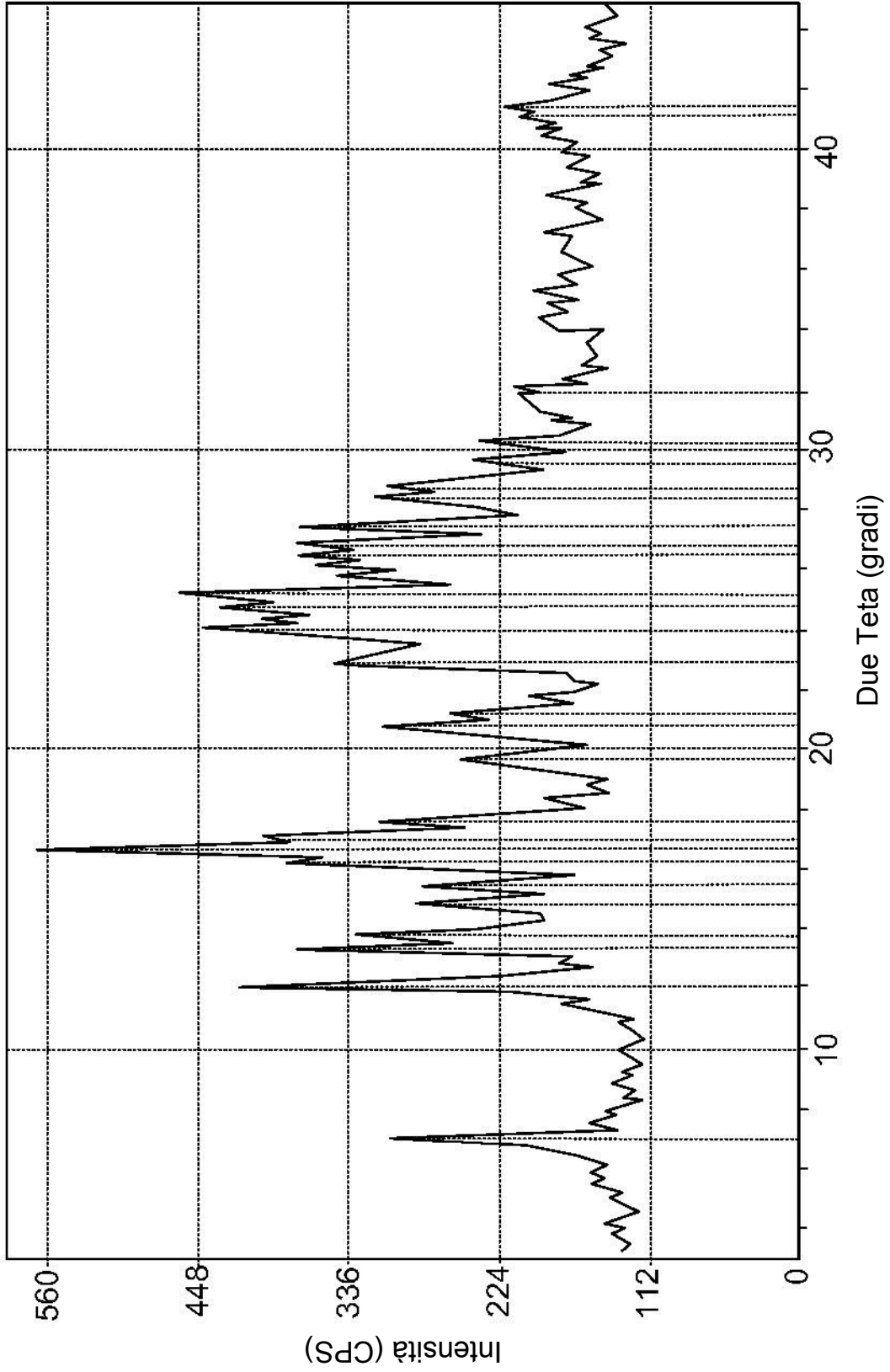


FIG. 6

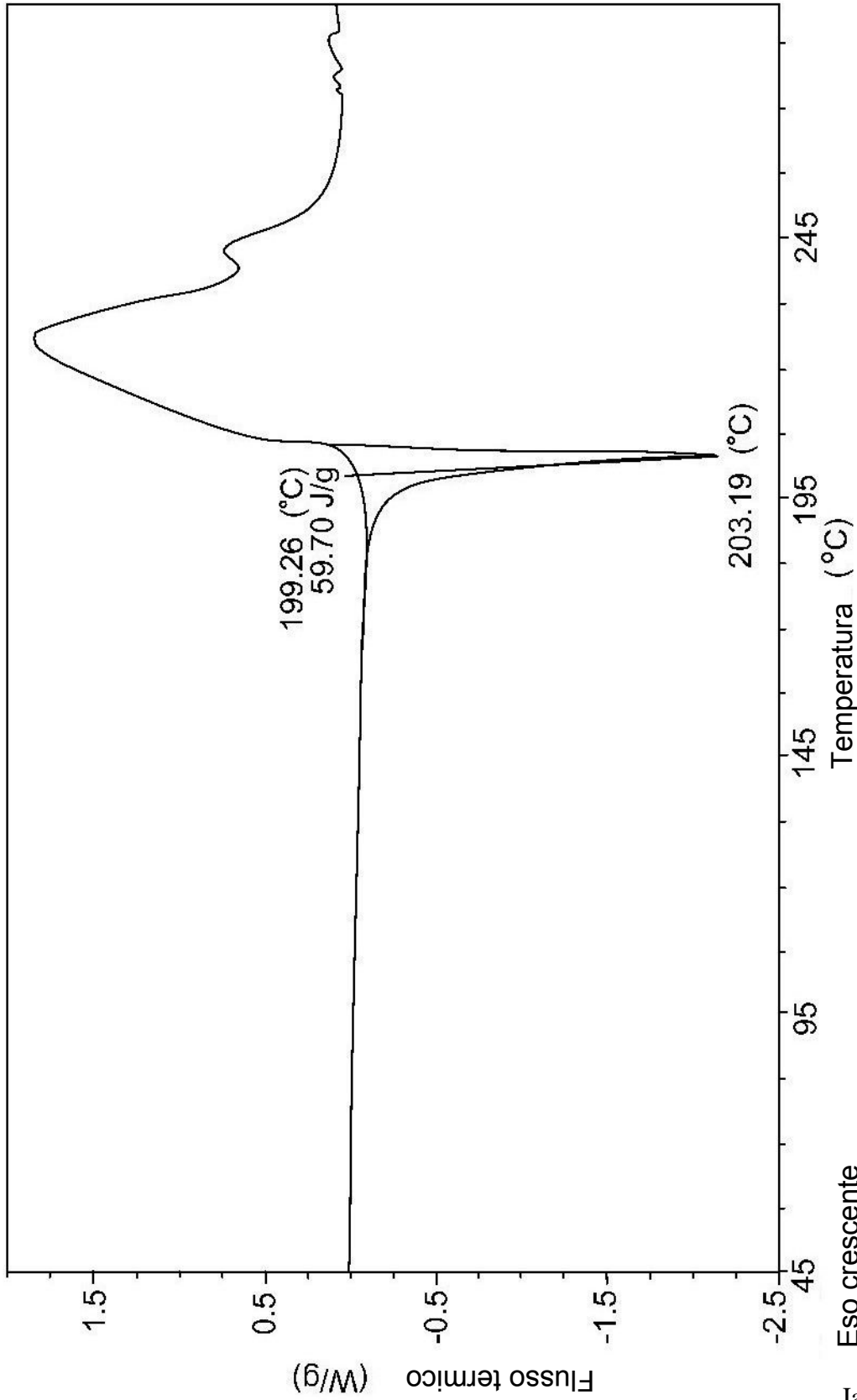
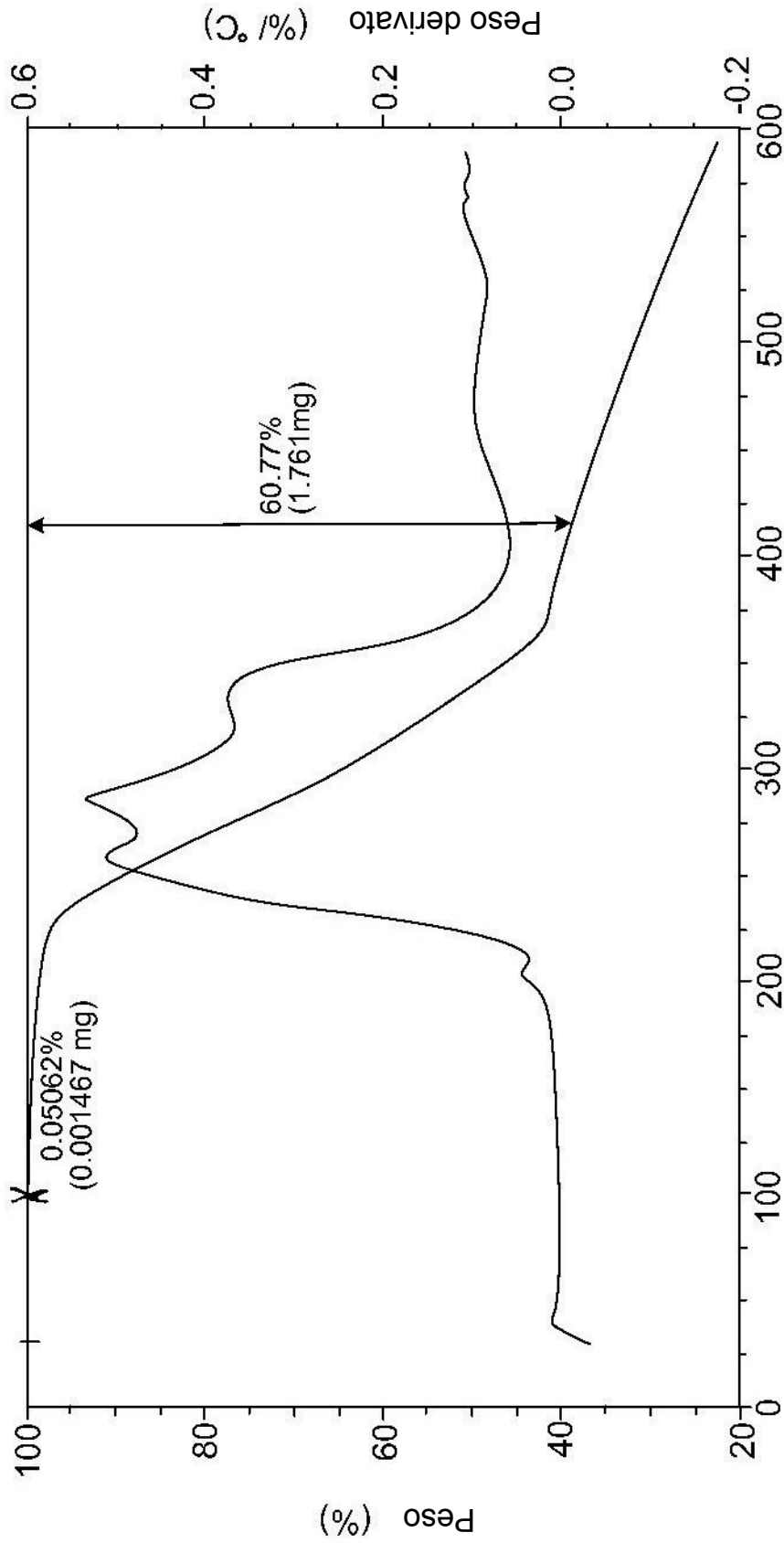


FIG. 7A

Universal V4.7A TA Strumentazione

Eso crescente



Universal V4.5A TA Strumentazione
FIG. 7B
Temperatura (°C)

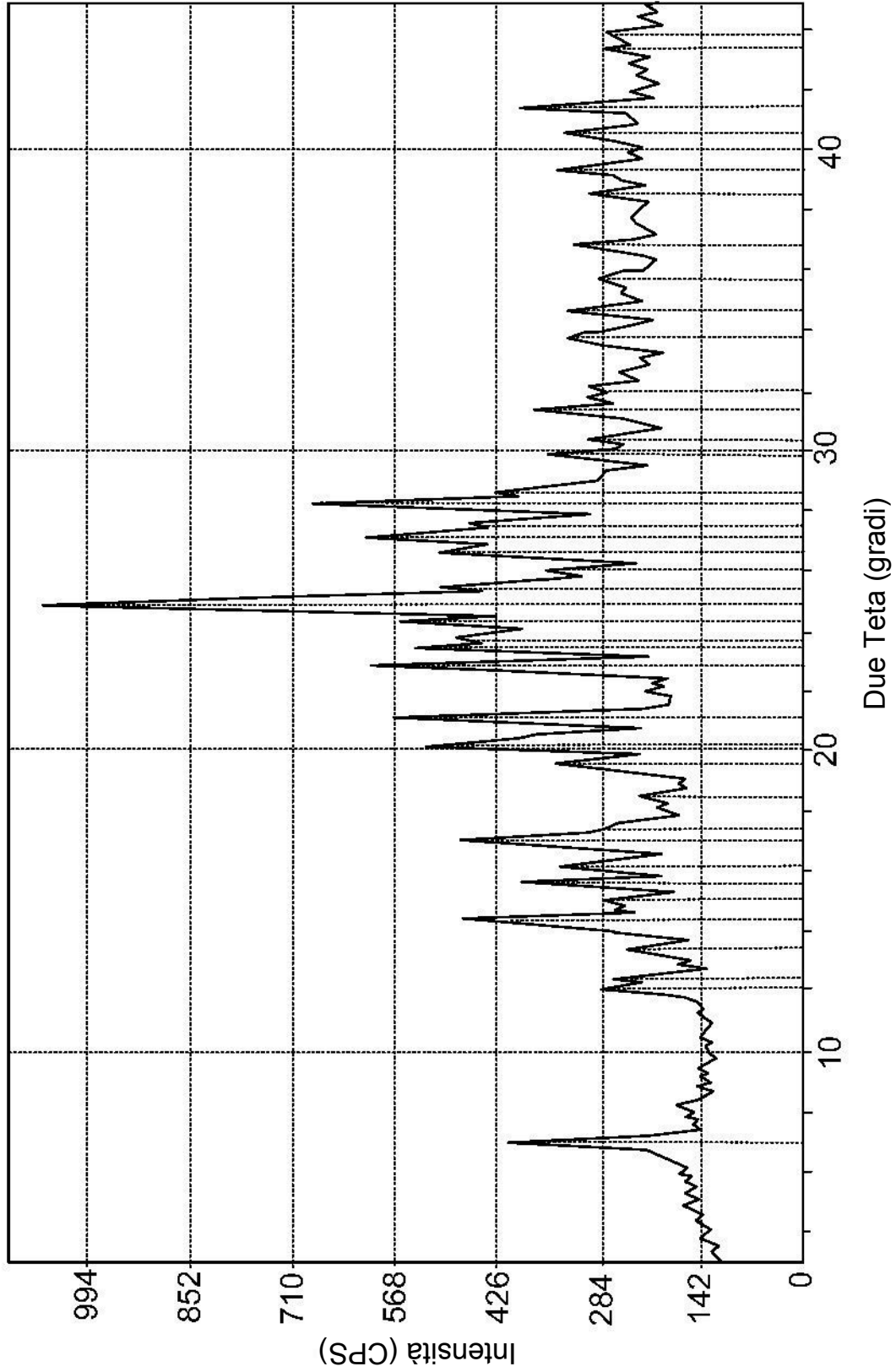
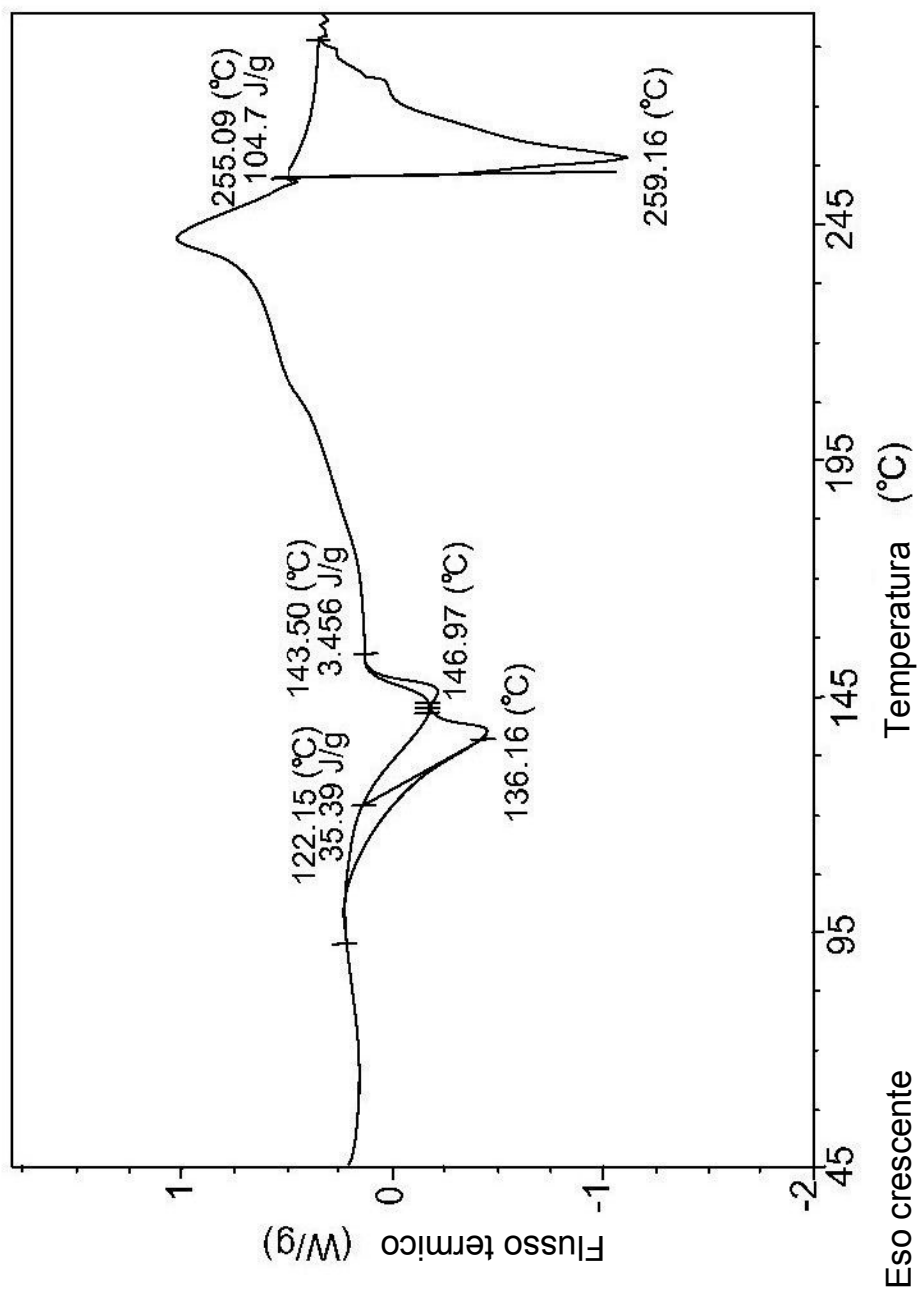


FIG. 7C



Universal V4.7A TA Strumentazione

FIG. 8A

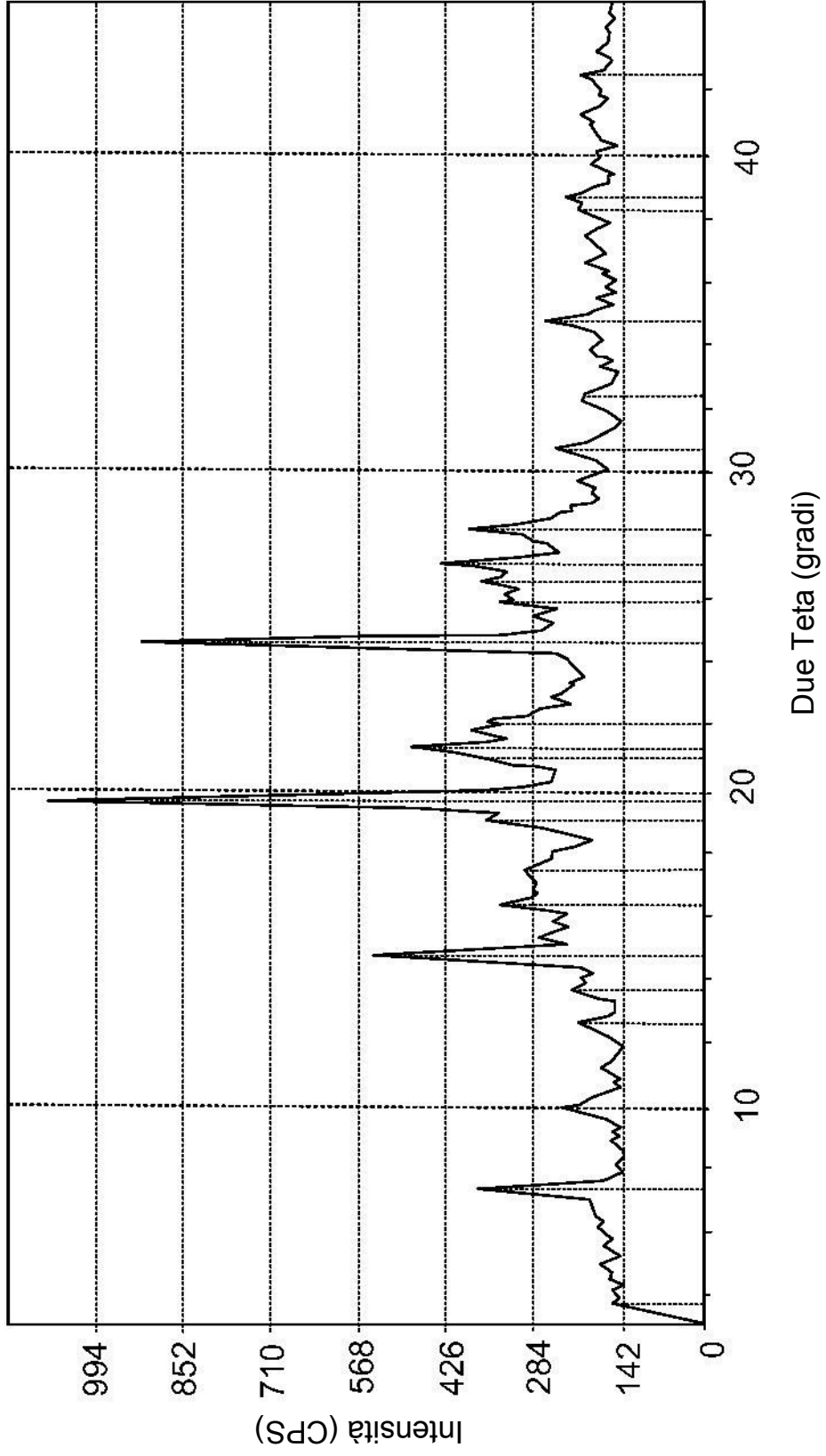


FIG. 8B

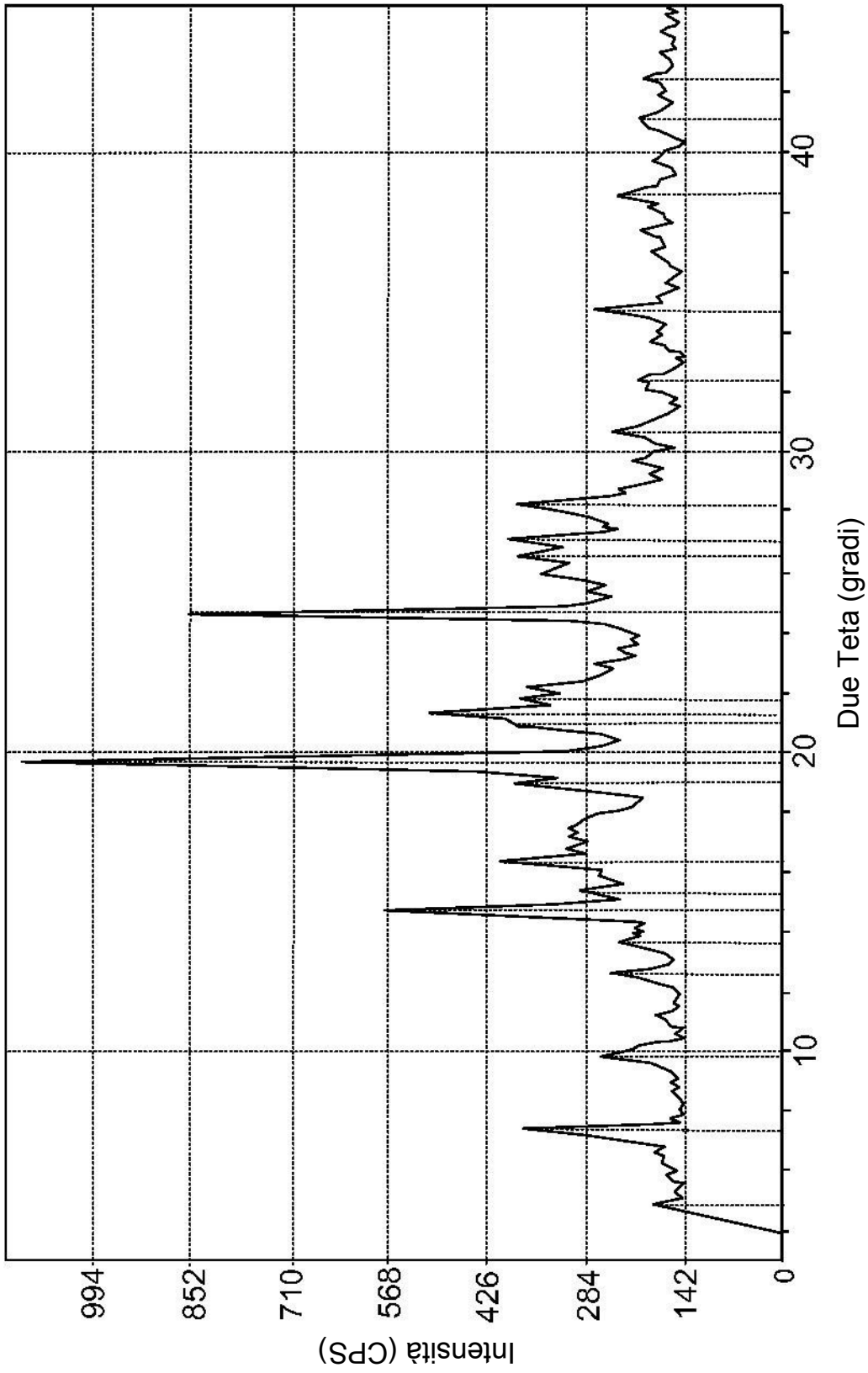


FIG. 9