



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2346864 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.07.01
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.03.06
(86)	Europeisk søknadsnr	09781073.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.07.24
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.27
(30)	Prioritet	2008.07.25, US, 135920 2009.06.26, US, 220685
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Galapagos N.V., Industriepark Mechelen Noord Generaal De Wittelaan L11 A 3, 2800 Mechelen, BE-Belgia
(72)	Oppfinner	MENET, Christel Jeanne Marie, Galapagos NVGeneraal De Wittelaan L11/A3, B-2800 Mechelen, BE-Belgia BLANC, Javier, Galapagos NVGeneraal De Wittelaan L11/A3, B-2800 Mechelen, BE-Belgia
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Nye forbindelser anvendbare for behandling av degenerative og inflammatoriske sykdommer
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2005 222 171 WO-A-2007/009773 WO-A-2008/025821 WO-A-2008/150015 WO-A-2009/010530 WO-A-2009/017954 WO-A-2009/027283 WO-A-2009/047514

Beskrivelse**Oppfinnelsens område**

Foreliggende oppfinnelse angår forbindelser som er inhibitorer av JAK, en familie av tyrosinkinaser som er involvert i moduleringen av degradering av brusk, ledd-
5 degenerering og sykdommer som involverer slik degradering og/eller inflammasjon. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av disse forbindelser, farmasøytiske preparater som omfatter disse forbindelser, fremgangsmåter for å forebygge og/eller behandle sykdommer som involverer degradering av brusk, degradering av ben og/eller ledd, tilstander som involverer
10 inflammasjon eller immunresponser, endotoksindrevne sykdomstilstander, sykdommer som involverer svekking av bruskutskifting (f.eks. sykdommer som involverer den anabolske stimulering av chondrocytter), misdannelser av kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, proliferative sykdommer og transplantasjonsavstøtning (f.eks. avstøtning av organtransplantat); og/eller metoder
15 for å forebygge og/eller behandle sykdommer som involverer bruskdegradering, ledddegradering og/eller inflammasjon ved administrering av forbindelser ifølge oppfinnelsen.

Januskinaser (JAK'er) er cytoplasmiske tyrosinkinaser som transduserer
20 cytokinsignaler fra membranreseptorer til STAT-transkripsjonsfaktorer. Fire JAK familiemedlemmer er beskrevet, JAK1, JAK2, JAK3 og TYK2. Ved binding av cytokinet til dets reseptor, vil JAK familiemedlemmer auto- og/eller transfosforilere hverandre, etterfulgt av fosforilering av STAT'er som deretter migrerer til kjernen for å modulere transkripsjon. JAK-STAT intracellulær signaltransduksjon tjener interferoner, mest
25 interleukiner, så vel som en rekke cytokiner og endokrine faktorer slik som EPO, TPO, GH, SOM, LIF, CNTF, GM-CSF, PRL Vainchenker W. et al. (2008).

Kombinasjonen av genetiske modeller og småmolekyl JAK-inhibitor forskning viste det terapeutiske potensial for en rekke JAK'er. JAK3 er validert ved mus og human
30 genetikk, som et immunsuppresjonsmål (O'Shea J. et al. (2004)). JAK3-inhibitorer ble vellykket brakt inn i klinisk utvikling, initialt for organtransplantatavstøtning, men senere også ved andre immuninflammatoriske indikasjoner slik som reumatoid artritt (RA), psoriasis og Crohns sykdom (<http://clinicaltrials.gov/>).

35 TYK2 er et potensielt mål for immuninflammatoriske sykdommer, som validert ved human genetikk og mus-knock-out-studier (Levy D. og Loomis C. (2007)).

JAK1 er et nytt mål i forbindelse med det immuninflammatoriske sykdomsområdet. JAK1 heterodimeriserer med de andre JAK'er for å transducere cytokindrevet pro-inflammatorisk signalering. Inhibering av JAK1 og/eller andre JAK'er forventes derfor å være av en terapeutisk fordel i forbindelse med en rekke inflammatoriske tilstander, så vel som for andre sykdommer som drives ved JAK-mediert signaltransduksjon.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Brusk er et avaskulært vev hvori chondrocytter er den viktigste cellulære komponenten. Chondrocyttene i normal artikulær brusk okkuperer omtrent 5 % av vevsvolumet, mens den ekstracellulære matriks utgjør de gjenværende 95 % av vevet. Chondrocyttene utskiller komponentene av matriksen, hovedsakelig proteoglykaner, kollagener, som i sin tur forsyner chondrocyttene med et miljø egnet for deres overlevelse under mekanisk påkjenning. Brusk, kollagen type II, sammen med protein kollagen type IX, er oppstilt i faste fibril-liknende strukturer som tilveiebringer brusk med stor mekanisk styrke. Proteoglykanene kan absorbere vann, og er ansvarlig for brusks elastiske og sjokkabsorberende egenskaper.

En av de funksjonelle rollene til brusk i leddet er å gjøre det mulig for ben å artikulere jevnt på hverandre. Tap av artikulær brusk fører derfor til at benene gnir mot hverandre, som fører til smerte og tap av mobilitet. Nedbrytning av brusk kan ha forskjellige årsaker. Ved inflammatorisk artritt, slik som f.eks. reumatoid artritt, er bruskdegradering bevirket ved sekresjon av proteaser (f.eks. kollagenaser) ved betente vev (f.eks. betent synovium). Bruskdegradering kan også være et resultat av skade i brusken, som skyldes ulykke eller kirurgi, eller overdreven belastning, eller "wear and tear". Bruskvevets evne til å regenerere etter slike hendelser er begrenset. Chondrocytter i skadet brusk utviser ofte nedsatt brusksyntetisering (anabolisk) aktivitet og/eller økt bruskdegradering (katabolisk) aktivitet.

Degradering av brusk er kjennetegnet på forskjellige sykdommer, hvoriblant reumatoid artritt og osteoartritt er de mest fremtredende. Reumatoid artritt (RA) er en kronisk ledd-degenerativ sykdom som er kjennetegnet ved inflammasjon og destruksjon av leddstrukturene. Når sykdommen er ukontrollert, fører den til vesentlig funksjonshemming og smerte som skyldes tap av leddfunksjonalitet, og til og med for tidlig død. Formålet med en RA-terapi er derfor ikke bare å moderere sykdommen, men også å oppnå remisjon for å stanse ledd-destruksjon. Foruten alvorligheten av sykdomsutgangen, betyr den høye prevalens av RA (~ 0,8 % av voksne er rammet verden over) en høy sosioøkonomisk innvirkning. (For omtaler av RA, refererer man til

Smolen og Steiner (2003); Lee og Weinblatt (2001); Choy og Panayi (2001); O'Dell (2004) og Firestein (2003)).

5 Osteoartritt (også omtalt som OA, eller "wear-and-tear" artritt) er den mest vanlige
formen for artritt, og er kjennetegnet ved tap av artikulær brusk, ofte forbundet med
hypertrofi av benet og smerte. Sykdommen rammer hovedsakelig hender og
vektbærende ledd, slik som knær, hofter og ryggrad. Denne prosess reduserer
brusken. Når overflatearealet har forsvunnet på grunn av reduksjonen, nås grad I
osteoartritt, når det tangentielle overflateareal har forsvunnet nås grad II osteoartritt.
10 Der er ytterligere nivåer av degenerering og destruksjon som påvirker dybde og de
kalsifiserte brusklag som grenser til det subchondrale benet. For en omfattende
oversikt over osteoartritt, vises det til Wieland et al., 2005.

De kliniske manifestasjoner på utviklingen av osteoartrittilstanden er: økt volum av
15 leddet, smerte, krepitasjon og funksjonell funksjonshemming som fører til smerte og
redusert mobilitet av leddene. Når sykdommen utvikler seg videre, vil smerte under
hvile fremkomme. Dersom tilstanden vedvarer uten korreksjon og/eller terapi,
ødelegges leddet som fører til funksjonshemming. Erstatningskirurgi med total protese
er da nødvendig.

20

Terapeutiske metoder for korreksjon av artikulære brusklesjoner som fremkommer
under osteoartrittsykdommen er blitt utviklet, men til nå har ingen av dem vært i
stand til å mediere regenerering av artikulær brusk in situ og in vivo.

25 Osteoartritt er vanskelig å behandle. Til nå er ingen kur tilgjengelig, og behandling
fokuserer på lindring av smerte, og å forhindre at det rammede ledd blir deformert.
Vanlige behandlinger inkluderer bruk av ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler
(NSAID'er). Skjønt kosttilskudd slik som chondroitin og glukosaminsulfat er blitt
forsvart til å være sikre og effektive valg for behandling av osteoartritt, viste et nylig
30 klinisk forsøk at begge behandlinger ikke reduserte smerte forbundet med osteoartritt.
(Clegg et al., 2006). Sett under ett, er ingen sykdomsmodifiserende osteoartritt-
legemidler tilgjengelige.

I alvorlige tilfeller kan ledderstatning være nødvendig. Dette er særlig reelt for hofter
35 og knær. Dersom et ledd er ekstremt smertefullt og ikke kan erstattes, kan det
fusjoneres. Denne prosedyren stanser smerten, men resulterer i permanent tap av
leddfunksjon, som gjør gåing og bøying vanskelig.

En annen mulig behandling er transplantasjon av dyrkede autologe chondrocytter. Her tas chondralt cellematerial fra pasienten og blir sendt til et laboratorium hvor det ekspanderes. Materialet implanteres deretter i de skadede vev for å dekke vevets defekter.

En annen behandling inkluderer intraartikulær instillasjon av Hylan G-F 20 (f.eks. Synvisc[®], Hyalgan[®], Artz[®]), en substans som temporært forbedrer reologien av synovialfluidet, produserer en nesten umiddelbar følelse av fri bevegelse, og en markert reduksjon av smerte.

Andre rapporterte metoder inkluderer anvendelse av tendinøse, periosteale, fasciale, muskulære eller perichondrale podinger, implantasjon av fibrin eller dyrkede chondrocytter, implantasjon av syntetiske matrikser slik som kollagen, karbonfiber, administrering av elektromagnetiske felt. Alle disse har rapportert minimale eller ufullstendige effekter som resulterer i et vev med dårlig kvalitet som verken understøtter vektbelastningen eller tillater restaurering av en artikulær funksjon med normal bevegelse.

Stimulering av de anabole prosesser, blokkering av katabole prosesser, eller en kombinasjon av disse to, kan resultere i stabilisering av brusken, og kanskje til og med reversering av skaden, og forhindrer derfor ytterligere progresjon av sykdommen. Forskjellige utløsere kan stimulere anabolsk stimulering av chondrocytter. Insulinliknende vekstfaktor-I (IGF-I) er den dominerende anabole vekstfaktor i synovialfluid og stimulerer syntesen av både proteoglykaner og kollagen. Det er også blitt vist at medlemmer av "bone morphogenetic protein" (BMP) familien, særlig BMP2, BMP4, BMP6 og BMP7, og medlemmer av "human transforming growth factor- β " (TGF- β) familien kan indusere chondrocytt anabolsk stimulering (Chubinskaya og Kuettner, 2003). En forbindelse er nylig blitt identifisert som induserer anabolsk stimulering av chondrocytter (US 6 500 854; EP 1 391 211). De fleste av disse forbindelser viser imidlertid alvorlige bivirkninger, og der er følgelig et sterkt behov for forbindelser som stimulerer chondrocytt differensiering uten disse bivirkninger.

Vandeghinste et al. (WO 2005/124342) oppdaget JAK1 som et mål hvis initiering kan ha terapeutisk relevans for en rekke sykdommer som inkluderer OA. JAK1 tilhører Janus kinase (JAK) familien av cytoplasmisk tyrosinkinase, involvert i

cytokinreseptormediert intracellulær signaltransduksjon. JAK-familien består av fire medlemmer: JAK1, JAK2, JAK3 og TYK2. JAK'er rekrutteres til cytokinreseptorer ved binding av cytokinet, etterfulgt av heterodimerisering av cytokinreseptoren og en delt reseptorsubenhhet (vanlig gamma-c-kjede, gp130). JAK'er aktiveres deretter ved auto- og/eller transfosforylering ved en annen JAK, resulterende i fosforylering av reseptorene, og rekruttering og fosforylering av medlemmer av signaltransduktoren og aktivator av transkripsjon (STAT'er). Fosforylerte STAT'er dimeriserer og translokerer til kjernen hvor de binder for å øke regioner av cytokinresponderbare gener. Knockout av JAK1-genet i mus viste at JAK1 spiller vesentlige og ikke-overflødige roller under utvikling: JAK1-/- mus døde innen 24 timer etter fødsel, og lymfocyttutvikling var alvorlig svekket. Dessuten var JAK1-/- celler ikke, eller mindre, reaktive mot cytokiner som anvender klasse II cytokinreseptorer, cytokinreseptorer som anvender gamma-c subenheten for signalering, og familien av cytokinreseptorer som anvender gp130 subenheten for signalering (Rodig et al., 1998).

Forskjellige grupper har implisert JAK-STAT-signalerings i chondrocyttbiologi. Li et al. (2001) viste at Oncostatin M induserer MMP og TIMP3 genekspresjon i primære chondrocytter ved aktivering av JAK/STAT og MAPK signaleringsspor. Osaki et al. (2003) viste at interferon-gammamediert inhibering av kollagen II i chondrocytter involverer JAK-STAT-signalerings. IL1-beta induserer bruskkatabolisme ved å redusere ekspresjon av matrikskomponenter, og ved å indusere ekspresjonen av kollagenaser og induserbar nitrogenoksid syntase (NOS2) som medierer produksjonen av nitrogenoksid (NO). Otero et al., (2005) viste at leptin og IL1-beta synergistisk induserte NO-produksjon eller ekspresjon av NOS2 mRNA i chondrocytter, og at dette var blokkert ved en JAK-inhibitor. Legendre et al. (2003) viste at IL6/IL6-reseptor induserte nedregulering av bruskspesifikke matriks-gen kollagen II, aggrecan-kjerne og linkprotein i bovine artikulære chondrocytter, og at dette var medierte ved JAK/STAT-signalerings. Disse observasjoner foreslår derfor en rolle for JAK kinaseaktivitet i bruskhømeostase, og terapeutiske muligheter for JAK kinaseinhibitorer.

JAK-familiemedlemmer er blitt implisert i ytterligere tilstander som inkluderer myoproliferative lidelser (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506), hvor mutasjoner i JAK2 er blitt identifisert. Dette indikerer at inhibitorer av JAK, særlig JAK2, også kan anvendes for behandling av myoproliferative lidelser. I tillegg er JAK-familien, særlig JAK1, JAK2 og JAK3, blitt forbundet med cancer, særlig leukemier, f.eks. akutt myeloid leukemi (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506,

Xiang et al., 2008, "Identification of somatic *JAK1* mutations in patients with acute myeloid leukemia" Blood First Edition Paper, publisert online 26. desember 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) og akutt lymfoblastisk leukemi (Millighan et al., 2009) eller faste tumorer, f.eks. uterin leiomyosarkom (Constantinescu et al., 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131), prostatacancer (Tam et al., 2007, British Journal of Cancer, 97, 378-383). Disse resultater indikerer at inhibitorer av JAK, særlig JAK1 og/eller JAK2, også kan ha anvendelse i behandling av cancer (leukemier og faste tumorer, f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer).

I tillegg skyldes Castlemans sykdom, multippel myelom, mesangial proliferativ glomerulonefritt, psoriasis og Kaposi sarkom sannsynligvis hypersekresjon av cytokin IL-6, hvis biologiske effekter medieres ved intracellulær JAK-STAT-signalering (Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto og Tadamitsu Kishimoto, Arthritis Res 2002, 4 (suppl 3):S233-S242). Dette resultatet viser at inhibitor av JAK, også kan finne anvendelse for behandling av disse sykdommer.

En forbindelse med autoimmune sykdommer er blitt etablert for JAK3 og Tyk2. Mutasjoner i JAK3 men også i oppstrømssignaleringskomponent gamma-c reseptorkjeden og IL7-reseptor svarer samlet for ~70 % av tilfeller av human alvorlig kombinert immunsvikt (O'Shea et al., 2004). Det skal bemerkes at JAK1 koopererer med JAK3 i transduksjon av signaler fra gamma-c reseptorkjeden. Tyk2 polymorfismer ses ved systemisk lupus erythematosus (SLE) (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506). Følgelig kan målsøking av JAK-familien tilveiebringe en terapeutisk mulighet innen det immunoinflammatoriske området.

De nåværende terapier er ikke tilfredsstillende, og der er derfor et behov for å identifisere ytterligere forbindelser som kan anvendes i behandling av sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser, slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabolske stimulering av chondrocytter), misdannelser av kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantasjonsavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK kan også finne anvendelse i

behandling av proliferative sykdommer. Særlig vil inhibitorer av JAK finne anvendelse i behandling av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor forbindelser, fremgangsmåter for deres fremstilling, og et farmasøytikum som omfatter en
 5 forbindelse ifølge oppfinnelsen, sammen med en passende farmasøytisk bærer. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også anvendelse av en forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for behandling av degenerative leddsykdommer.

10 WO 2008/025821 omhandler substituerte [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridiner som proteinkinaseinhibitorer for behandling av immunologiske, inflammatoriske, allergiske eller andre sykdommer.

WO 2007/009773 omhandler substituerte pyrazol[1,5-a]pyrimidiner som
 15 proteinkinaseinhibitorer.

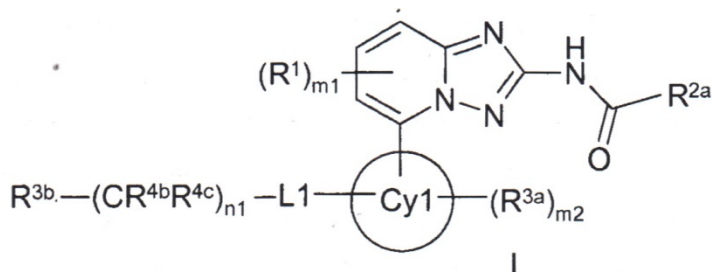
US 2005/222171 omhandler substituerte pyrazol[1,5-a]pyrimidiner som proteinkinaseinhibitorer.

20 **Oppsummering av oppfinnelsen**

Den foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen om at inhibitorer av JAK er anvendbare for behandling av sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser, slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt,
 25 psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabole stimulering av chondrocytter),
 30 misdannelser i konvenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantatavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibering av JAK kan også finne anvendelse i behandling av proliferative sykdommer. Særlig kan inhibitorer av JAK finne anvendelse i behandlingen av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). Den foreliggende oppfinnelse
 35 tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av disse forbindelser, farmasøytiske preparater som omfatter disse forbindelser og metoder for å behandle

sykdommer som involverer bruskdegradering, ledd-degradering og/eller inflammasjon ved administrering av en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

JAK-inhibitorer inkluderer 1,2,4-triazol[1,5-a]pyridinforbindelser med formel (I):



hvor

Cy1 er valgt fra aryl og heteroaryl;

L1 er valgt fra en enkeltbinding, -O-, -C(O)-, -C[=N(R^{4a})]-, -N(R^{4a})-, -CON(R^{4a}), -SO₂N(R^{4a})-, -S(O)₂-, -N(R^{4a})CO-, eller -N(R^{4a})SO₂-;

hver R¹ er uavhengig valgt fra C₁-C₆-alkyl, substituert C₁-C₆-alkyl, acyl, substituert acyl, substituert eller usubstituert acylamino, substituert eller usubstituert C₁-C₆-alkoksy, substituert eller usubstituert amido, substituert eller usubstituert amino, substituert sulfinyl, substituert sulfonyl, substituert eller usubstituert aminosulfonyl, sulfonsyre, sulfonsyreester, karboksy, cyano, substituert eller usubstituert C₃-C₇-sykloalkyl, substituert eller usubstituert 4-7 leddet heterosykloalkyl, halo og hydroksyl;

hver R^{3a} er uavhengig valgt fra C₁-C₆-alkyl, substituert C₁-C₆-alkyl, acyl, substituert acyl, substituert eller usubstituert acylamino, substituert eller usubstituert C₁-C₆-alkoksy, substituert eller usubstituert amido, alkoksykarbonyl, substituert alkoksykarbonyl, arylalkyloksy, substituert arylalkyloksy, substituert eller usubstituert amino, aryl, substituert aryl, arylalkyl, substituert sulfanyl, substituert sulfinyl, substituert sulfonyl, substituert eller usubstituert aminosulfonyl, sulfonsyre, sulfonsyreester, azido, karboksy, cyano, substituert eller usubstituert C₃-C₇-sykloalkyl, substituert eller usubstituert 4-7 leddet heterosykloalkyl, halo, substituert eller usubstituert heteroaryl, hydroksyl, nitro og tiol;

R^{2a} er valgt fra substituert eller usubstituert C_1 - C_6 -alkyl eller substituert eller usubstituert C_3 - C_7 -sykloalkyl;

R^{3b} er uavhengig valgt fra substituert eller usubstituert aryl, substituert eller usubstituert C_3 - C_7 -sykloalkyl, substituert eller usubstituert 4-7 leddet heterosykloalkyl, substituert eller usubstituert 5-10 leddet heteroaryl; eller R^{3b} er uavhengig valgt fra O- R^{3c} , CO- R^{3c} og CON(R^{4a})- R^{3c} ; og R^{3c} er uavhengig valgt fra substituert eller usubstituert aryl, substituert eller usubstituert C_3 - C_7 -sykloalkyl, substituert eller usubstituert 4-7 leddet heterosykloalkyl, substituert eller usubstituert 5-10 leddet heroaryl;

hver R^{4a} , R^{4b} og R^{4c} er uavhengig valgt fra H, C_1 - C_6 -alkyl, substituert C_1 - C_6 -alkyl, C_3 - C_7 -sykloalkyl, eller substituert C_3 - C_7 -sykloalkyl;

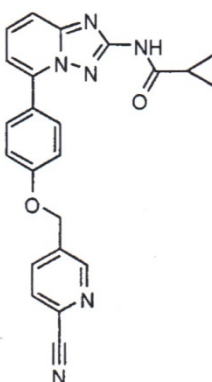
m_1 er 0, 1 eller 2; m_2 er 0, 1, 2 eller 3; og n_1 er 0, 1, 2, 3 eller 4;

med den betingelse at

når L_1 er -O-, -N(R^{4a})-, -CON(R^{4a})-, eller -SO₂N(R^{4a})-, og R^{3b} er annet enn sykloalkyl, aryl eller 5-10 leddet heteroaryl, da er n_1 lik 1, 2, 3 eller 4;

eller farmasøytisk aksepterbare salter eller solvater derav, eller solvater av de farmasøytisk aksepterbare salter.

Ifølge oppfinnelsen er det tilveiebrakt en forbindelse i henhold til formel VIa:



VIa

eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse farmasøytiske preparater som omfatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen, og en farmasøytisk bærer, 5 eksipiens eller fortynningsmiddel. I dette aspektet av oppfinnelsen kan det farmasøytiske preparat omfatte én eller flere av forbindelsene beskrevet her. Dessuten er forbindelsene ifølge oppfinnelsen som er anvendbare i de farmasøytiske preparater og behandlingsmetoder som omtalt her, alle farmasøytisk aksepterbare 10 som fremstilt og anvendt.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare i en metode for å behandle et pattedyr som er mottakelig for eller rammet av en tilstand blant dem som er angitt her, særlig slike tilstander som kan være forbundet med avvikende JAK-aktivitet, 15 f.eks. sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser, slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter 20 bypassinngrep, eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer anabol stimulering av chondrocytter), misdannelser i kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantasjonsavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK 25 kan også finne anvendelse i behandling av proliferative sykdommer. Særlig vil inhibitorer av JAK finne anvendelse i behandling av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). Særlig er forbindelsene ifølge oppfinnelsen anvendbare i en metode for å behandle tilstander valgt fra inflammasjon, slik som reumatoid artritt, juvenil idiopatisk artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom 30 (f.eks. astma, rinitt), inflammatoriske tarmsykdommer (f.eks. Crohns sykdom, kolitt), endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og organtransplantatavstøtning; og brusk-, ben- og/eller ledd-degradering eller degenerering, slik som osteoartritt, hvilken metode omfatter å administrere en effektiv 35 mengde av én eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser som er beskrevet her.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er anvendbare i en metode for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller rammet av, proliferative lidelser, særlig cancer (f.eks. faste tumorer), leukemier, multippel myelom eller psoriasis, hvilken metode omfatter administrering av en effektiv mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser som beskrevet her.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling eller forebygging av en tilstand valgt fra dem som er angitt her, særlig slike tilstander som kan være forbundet med avvikende JAK-aktivitet, slik som sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser, slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabole stimulering av chondrocytter), misdannelser i kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantasjonsavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK kan også finne anvendelse i behandling av proliferative sykdommer. Særlig kan inhibitorer av JAK finne anvendelse i behandling av cancer, særlig leukemier av faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). I en spesifikk utførelsesform er tilstanden valgt fra inflammasjon, slik som reumatoid artritt, juvenil idiopatisk artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), inflammatoriske tarmsykdommer (f.eks. Crohns sykdom, kolitt), endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og organtransplantatavstøtning; og brusk-, ben- og/eller ledd-degradering eller degenerering, slik som osteoartritt.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling eller forebygging av proliferative lidelser, særlig cancer (f.eks. faste tumorer), leukemier, multippel myelom eller psoriasis.

I en ytterligere metode av behandlingsaspektet er der omtalt en metode for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller rammet av, en tilstand hvis årsak er relatert til unormal JAK-aktivitet som beskrevet her, og som omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser som beskrevet her.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling eller forebygging av en tilstand viss årsak er relatert til unormal JAK-aktivitet.

I ytterligere aspekter tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å syntetisere en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, som representerer synteseprotokoller og synteseveier som omtalt senere her.

Det er følgelig et viktig formål for denne oppfinnelse å tilveiebringe nye forbindelser som kan modifisere aktiviteten av JAK, og således forhindre eller behandle eventuelle sykdommer som årsaksmessig kan være relatert dertil.

Det er et ytterligere formål med denne oppfinnelse å tilveiebringe forbindelser som kan behandle eller lindre sykdom eller symptomer på de samme, slik som brusk- og/eller bendeigradering og relatert inflammasjon, og leddsykdommer som årsaksmessig kan være relatert til aktiviteten av JAK.

Et enda ytterligere formål med denne oppfinnelse er å tilveiebringe farmasøytiske preparater som kan anvendes i behandling eller forebygging av en rekke sykdomstilstander som inkluderer sykdommer forbundet med JAK-aktivitet, slik som sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabole stimulering av chondrocytter), misdannelse av kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantasjonsavstøtning (f.eks.

organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK kan også finne anvendelse i behandling av proliferative sykdommer. Særlig vil inhibitorer av JAK finne anvendelse i behandling av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). I en spesifikk utførelsesform er tilstanden valgt fra inflammasjon, slik
 5 som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og organtransplantatavstøtning; og brusk-, ben- og/eller ledd-degradering eller
 10 degenerering, slik som osteoartritt eller cancer (f.eks. faste tumorer eller leukemier).

Andre formål og fordeler vil fremkomme klart for en fagkyndig på området ut fra en overveielse av den påfølgende detaljerte beskrivelse.

15 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Definisjoner

De etterfølgende betegnelser skal ha betydningene som presentert nedenfor og er
 20 anvendbare for å forstå beskrivelsen og den tilsiktede rammen for den foreliggende oppfinnelse.

20

Ved beskrivelse av oppfinnelsen, som kan inkludere forbindelser, farmasøytiske preparater som inneholder slike forbindelser, og metoder for å anvende slike forbindelser og preparater, har de etterfølgende betegnelser, om tilstede, de etterfølgende betydninger dersom annet ikke er indikert. Artiklene "en/ei/et" kan
 25 anvendes her for å referere til én eller flere enn én (dvs. minst én) av artikkelens grammatikalske objekter. Som et eksempel betyr "en analog" én analog eller flere enn én analoger.

25

"Acyl" refererer til et radikal $-C(O)R^{20}$, hvor R^{20} er hydrogen, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkylmetyl, 4-10 leddet heterosykloalkyl, aryl, arylalkyl, 5-10 leddet heteroaryl eller heteroarylalkyl som definert her. Representative eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, formyl, acetyl, sykloheksylkarbonyl, sykloheksylmetylkarbonyl, benzoyl og benzylkarbonyl. Eksempler på "acyl"-grupper er
 30 $-C(O)H$, $-C(O)-C_1-C_8$ -alkyl, $-C(O)-(CH_2)_t(C_6-C_{10}$ -aryl), $-C(O)-(CH_2)_t$ (5-10 leddet heteroaryl), $-C(O)-(CH_2)_t(C_3-C_{10}$ -sykloalkyl), og $-C(O)-(CH_2)_t$ (4-10 leddet heterosykloalkyl), hvor t er et helt tall fra 0 til 4. "Alkoksylkarbonyl" refererer til et radikal $-C(O)-OR^{27}$ hvor R^{27} representerer et C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkyl, C_3 - C_{10} -

35

sykloalkylalkyl, 4-10 leddet heterosykloalkylalkyl, aralkyl, eller 5-10 leddet heteroarylalkyl som definert her. Eksempler på "alkoksykarbonyl"-grupper er C(O)O-C₁-C₈-alkyl, -C(O)O-(CH₂)_t(C₆-C₁₀-aryl), -C(O)O-(CH₂)_t(5-10 leddet heteroaryl), -C(O)O-(CH₂)_t(C₃-C₁₀-sykloalkyl), og -C(O)O-(CH₂)_t(4-10 leddet heterosykloalkyl), hvor t er et heltall fra 1 til 4.

"Alkyl" betyr rettkjedet eller forgrenet alifatisk hydrokarbon med 1 til 20 karbonatomer. Alkyl har særlig 1 til 12 karbonatomer. Mer spesielt er lavere alkyl som har 1 til 6 karbonatomer. En ytterligere spesiell gruppe har 1 til 4 karbonatomer. Eksempler på rettkjedede grupper inkluderer metyl, etyl, n-propyl og n-butyl. Forgrenet betyr at én eller flere lavere alkylgrupper slik som metyl, etyl, propyl eller butyl er festet til en lineær alkylkjede, og eksempler på grupper med forgrenet kjede inkluderer isopropyl, isobutyl, t-butyl og isoamyl.

"Amino" refererer til -NH₂-radikalet.

"Arylalkyl" refererer til en alkylgruppe som definert ovenfor, substituert med én eller flere arylgrupper som definert ovenfor. Særlig alkyl- eller arylalkylgrupper er alkylgrupper substituert med én arylgruppe.

20

"Aryl" refererer til en monovalent aromatisk hydrokarbongruppe avledet ved fjerning av ett hydrogenatom fra et enkelt karbonatom i et moder-aromatisk ringsystem. Særlig refererer aryl til en aromatisk ringstruktur, monosyklisk eller polysyklisk som inkluderer fra 5-12 ringmedlemmer, mer vanlig fra 6 til 10. Der arylgruppen er et monosyklisk ringsystem, inneholder det foretrukket 6 karbonatomer. Typiske arylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, grupper avledet fra aceantrylen, acenaftyle, acefenaftyle, antracen, azulen, benzen, krysen, koronen, fluoranten, fluoren, heksacen, heksafen, heksalen, as-indacen, s-indacen, indan, inden, naftalen, oktacen, oktafen, oktalen, ovalen, penta-2,4-dien, pentacen, pentalen, pentaften, perylen, fenalen, fenantren, picen, pleiaden, pyren, pyrantren, rubicen, trifenylen og trinaftalen. Særlige arylgrupper inkluderer fenyl, naftyl, indenyl og tetrahydronaftyl.

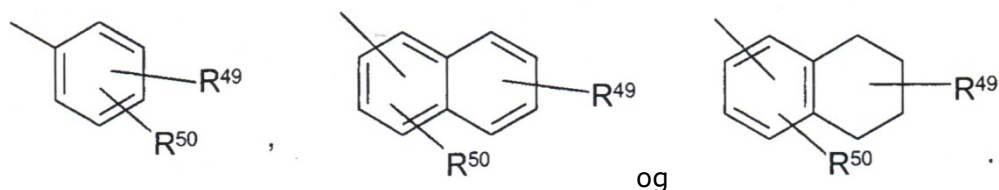
"Substituert aryl" refererer til en arylgruppe substituert med én eller flere av disse grupper som er angitt i definisjonen av "substituert" her, og refererer særlig til en arylgruppe som eventuelt kan være substituert med én eller flere substituent, f.eks. fra 1 til 5 substituent, særlig 1 til 3 substituent, særlig 1 substituent. "Substituert aryl" refererer særlig til en arylgruppe som er substituert med én eller flere grupper

35

valgt fra halo, C₁-C₈-alkyl, C₁-C₈-haloalkyl, C₁-C₈-haloalkoksy, cyano, hydroksy, C₁-C₈-alkoksy og amino.

Eksempler på representative substituerte aryl er inkludert det følgende

5



I disse formler kan én av R⁴⁹ og R⁵⁰ være hydrogen, og minst én av R⁴⁹ og R⁵⁰ er hver uavhengig valgt fra C₁-C₈-alkyl, 4-10 leddet heterosykloalkyl, alkanoyl, C₁-C₈-alkoksy, hetero-O-aryl, alkylamino, arylamino, heteroarylamino, NR⁵¹COR⁵², NR⁵¹SOR⁵², NR⁵¹SO₂R⁵², COOalkyl, COOaryl, CONR⁵¹R⁵², CONR⁵¹OR⁵², NR⁵¹R⁵², SO₂NR⁵¹R⁵², S-alkyl, SOalkyl, SO₂alkyl, Saryl, SOaryl, SO₂aryl; eller R⁴⁹ og R⁵⁰ kan være forenet til å danne en syklisk ring (mettet eller umettet) med fra 5 til 8 atomer, som eventuelt inneholder ett eller flere heteroatomer valgt fra gruppen N, O eller S. R⁵¹ og R⁵² er uavhengig hydrogen, C₁-C₈-alkyl, C₁-C₄-haloalkyl, C₃-C₁₀-sykloalkyl, 4-10 leddet heterosykloalkyl, C₆-C₁₀-aryl, substituert aryl, 5-10 leddet heteroaryl.

“Sykloalkyl” refererer til sykliske ikke-aromatiske hydrokarbylgrupper med fra 3 til 10 karbonatomer. Slike sykloalkylgrupper inkluderer, som et eksempel, enkeltringstrukturer slik som syklopropyl, syklobutyl, syklopentyl, sykloheksyl, sykloheptyl og syklooktyl.

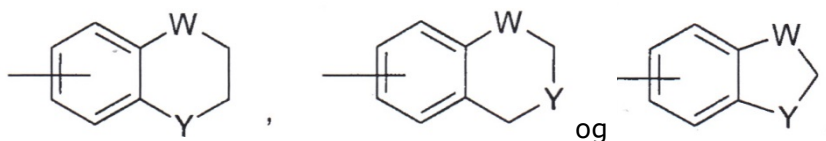
“Cyano” refererer til radikalet -CN.

“Halo” eller “halogen” refererer til fluor (F), klor (Cl), brom (Br) og jod (I). Særlig halogrupper er enten fluor eller klor.

“Hetero” når anvendt for å beskrive en forbindelse eller en gruppe tilstede på en forbindelse betyr at ett eller flere karbonatomer i forbindelsen eller gruppen er blitt erstattet med et nitrogen-, oksygen- eller svovelheteroatom. Hetero kan anvendes for hvilken som helst av hydroarbylgruppene som beskrevet ovenfor, slik som alkyl, f.eks. heteroalkyl, sykloalkyl, f.eks. heterosykloalkyl, aryl, f.eks. heteroaryl, sykloalkenyl, f.eks. sykloheteroalkenyl, og liknende med fra 1 til 5, og særlig fra 1 til 3 heteroatomer.

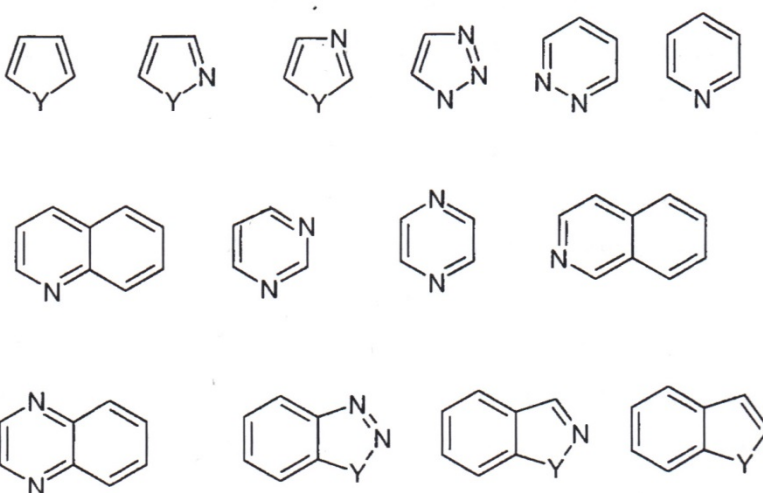
"Heteroaryl" betyr en aromatisk ringstruktur, monosyklisk eller polysyklisk, som inkluderer ett eller flere heteroatomer og 5 til 12 ringmedlemmer, mer vanlig 5 til 10 ringmedlemmer. Heteroarylgruppen kan f.eks. være en fem-leddet eller seks-leddet monosyklisk ring eller en bisyklisk struktur dannet fra kondenserte fem- og seks-leddede ringer, eller to kondenserte seks-leddede ringer, eller, som et ytterligere eksempel, to kondenserte fem-leddede ringer. Hver ring kan inneholde opptil fire heteroatomer, som typisk er valgt fra nitrogen, svovel og oksygen. Heteroarylringen vil typisk inneholde opptil fire heteroatomer, mer typisk opptil tre heteroatomer, mer vanligvis opptil to, f.eks. et enkelt heteroatom. I én utførelsesform inneholder heteroarylringen minst ett ringnitrogenatom. Nitrogenatomene i heteroarylringene kan være basiske, som i tilfellet av imidazol eller pyridin, eller i alt vesentlig ikke-basiske, som i tilfellet av indol eller pyrrolnitrogen. Generelt vil antallet basiske nitrogenatomer tilstede i heteroarylgruppen, som inkluderer hvilke som helst aminogruppe-substituenten i ringen, være mindre enn fem. Eksempler på fem-leddede monosykliske heteroarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, pyrrol-, furan-, tiofen-, imidazol-, furazan-, oksazol-, oksadiazol-, oksatriazol-, isoksazol-, tiazol-, isotiazol-, pyrazol-, triazol- og tetrazolgrupper. Eksempler på seks-leddede monosykliske heteroarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, pyridin, pyrazin, pyridazin, pyrimidin og triazin. Særlig eksempler på bisykliske heteroarylgrupper som inneholder en fem-leddet ring kondensert til en annen fem-leddet ring inkluderer, men er ikke begrenset til, imidazotiazol og imidazoimidazol. Særlige eksempler på bisykliske heteroarylgrupper som inneholder en seks-leddet ring kondensert med en fem-leddet ring, inkluderer, men er ikke begrenset til, benzofuran, benzotiofen, benzimidazol, benzoksazol, isobenzoksazol, benzisoksazol, benzotiazol, benzisotiazol, isobenzofuran, indol, isoindol, isoindolon, indolizin, indolin, isoindolin, purin (f.eks. adenin, guanin), indazol, pyrazolpyrimidin, triazolpyrimidin, benzodioksol og pyrazolpyridingrupper. Særlige eksempler på bisykliske heteroarylgrupper som inneholder to kondenserte seks-leddede ringer inkluderer, men er ikke begrenset til, kinolin-, isokinolin-, kroman-, tiokroman-, kromen-, isokromen-, kroman-, isokroman-, benzodioksan-, kinolizin-, benzoksazin-, benzodiazin-, pyridopyridin-, kinoksalin-, kinazolin-, cinnolin-, ftalazin-, naftyridin- og pteridingrupper. Særlige heteroarylgrupper er dem avledet fra tiofen, pyrrol, benzotiofen, benzofuran, indol, pyridin, kinolin, imidazol, oksazol og pyrazin.

Eksempler på representativt aryl med heteroatomer som inneholder substitusjon inkluderer det etterfølgende:



5 hvor hver W er valgt fra $C(R^{54})_2$, NR^{54} , O og S; og hver Y er valgt fra karbonyl, NR^{54} , O og S; og R^{54} er uavhengig hydrogen, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkyl, 4-10 leddet heterosykloalkyl, C_6 - C_{10} -aryl, og 5-10 leddet heteroaryl.

Eksempler på representative heteroaryler inkluderer de følgende:



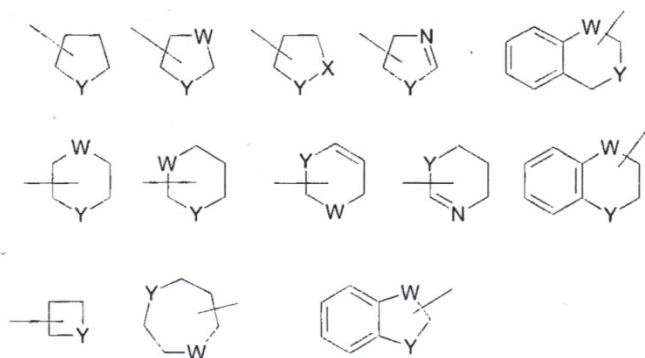
10

hvor hver Y er valgt fra karbonyl, N, NR^{55} , O og S; og R^{55} er uavhengig hydrogen, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkyl, 4-10 leddet heterosykloalkyl, C_6 - C_{10} -aryl, og 5-10 leddet heteroaryl.

15 Som anvendt heri refererer betegnelsen "heterosykloalkyl" til en 4-10 leddet, stabil heterosyklisk ikke-aromatisk ring og/eller inkluderer ringene som inneholder ett eller flere heteroatomer som uavhengig er valgt fra N, O og S, kondensert dertil. Et kondensert heterosyklisk ringsystem kan inkludere karbosykliske ringer, og behøver bare inkludere én heterosyklisk ring. Eksempler på heterosykliske ringer inkluderer, 20 men er ikke begrenset til, morfolin, piperidin (f.eks. 1-piperidinyl, 2-piperidinyl, 3-piperidinyl og 4-piperidinyl), pyrrolidin (f.eks. 1-pyrrolidinyl, 2-pyrrolidinyl og 3-pyrrolidinyl), pyrrolidon, pyran (2H-pyran eller 4H-pyran), dihydrotiofen, dihydropyran, dihydrofuran, dihydrotiazol, tetrahydrofuran, tetrahydrotiofen, dioksan, tetrahydropyran (f.eks. 4-tetrahydropyranyl), imidazolin, imidazolidinon, oksazolin, 25 tiazolin, 2-pyrazolin, pyrazolidin, piperazin og N-alkylpiperaziner, slik som N-

metylpiperazin. Ytterligere eksempler inkluderer tiomorfolin og dets S-oksider og S,S-dioksider (særlig tiomorfolin). Enda ytterligere eksempler inkluderer azetidin, piperidon, piperazon og N-alkylpiperidiner, slik som N-metylpiperidin. Særlig eksempler på heterosykloalkylgrupper er vist i de etterfølgende illustrerende eksempler:

5



hvor hver W er valgt fra CR^{56} , $C(R^{56})_2$, NR^{56} , O og S; og hver Y er valgt fra NR^{56} , O og S; og R^{56} er uavhengig hydrogen, C_1 - C_8 -alkyl, C_3 - C_{10} -sykloalkyl, 4-10 leddet

heterosykloalkyl, C_6 - C_{10} -aryl, 5-10 leddet heteroaryl. Disse heterosykloalkylringer kan eventuelt være substituert med én eller flere grupper valgt fra gruppen som består av acyl, acylamino, acyloksy, (-O-acyl eller $-OC(O)R^{20}$), alkoksy, alkoksykarbonyl, alkoksykarbonylamino ($-NR''$ -alkoksykarbonyl eller $-NH-C(O)-OR^{27}$), amino, substituert amino, aminokarbonyl (amido eller $-C(O)-NR''_2$), aminokarbonylamino ($-NR''-C(O)-NR''_2$), aminokarbonyloksy ($-O-C(O)-NR''_2$), aminosulfonyl, sulfonylamino, aryl, -O-aryl, azido, karboksyl, cyano, sykloalkyl, halogen, hydroksy, nitro, tiol, -S-alkyl, -S-aryl, -S(O)-alkyl, -S(O)-aryl, -S(O)₂-alkyl, og -S(O)₂-aryl. Substitueringsgrupper inkluderer karbonyl eller tiokarbonyl som f.eks. tilveiebringer laktam- og ureaderivater.

20

En fagkyndig på området innen organisk syntese vil se at det maksimale antall heteroatomer i en stabil, kjemisk mulig heterosyklisk ring, enten den er aromatisk eller ikke-aromatisk, bestemmes ved ringstørrelsen, grad av umettethet og heteroatomenes valens. Generelt kan en heterosyklisk ring ha fra to til fire heteroatomer, så lenge den heteroaromatiske ringen er kjemisk mulig og stabil.

25

"Farmasøytisk akseptert" betyr godkjent eller som kan godkjennes av en regulerende myndighet innen forbundsstaten, eller av et offentlig styre eller tilsvarende myndighet i land annet enn USA, eller som er listet opp i the US

Pharmacopoeia eller annen generelt anerkjent pharmacopoeia for anvendelse i dyr, mer spesielt i mennesker.

5 "Farmasøytisk aksepterbart salt" refererer til et salt av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som er farmasøytisk aksepterbart, og som utviser den ønskede farmakologiske aktiviteten til moderforbindelsen. Spesielt kan slike salter som er ikke-toksiske være uorganiske eller organiske syreaddisjonssalter og baseaddisjonssalter. Spesifikt inkluderer slike salter: (1) syreaddisjonssalter dannet med uorganiske syrer slik som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og liknende; 10 eller dannet med organiske syrer slik som eddiksyre, propionsyre, heksansyre, syklopentanpropionsyre, glykolsyre, druesyre, melkesyre, malonsyre, ravsyre, eplesyre, maleinsyre, ravsyre, vinsyre, sitronsyre, benzosyre, 3-(4-hydroksybenzoyl)benzosyre, kanelisyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etandisulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, 4- 15 klorbenzensulfonsyre, 2-naftalensulfonsyre, 4-toluensulfonsyre, kamfersulfonsyre, 4-metylbisyklo[2.2.2]-okt-2-en-1-karboksylysyre, glukohexonsyre, 3-fenylpropionsyre, trimetyleddiksyre, tertiær butyleddiksyre, laurylsvovelsyre, glukonsyre, glutamsyre, hydroksynaftosyre, salicylsyre, stearinsyre, mukonsyre og liknende; eller (2) salter dannet når et surt proton tilstede i moderforbindelsen enten erstattes med et 20 metallion, f.eks. et alkalimetallion, et jordalkalimetallion, eller et aluminiumion; eller koordinerer med en organisk base slik som etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, N-metylglukamin og liknende. Salter inkluderer videre, men kun som et eksempel, natrium, kalium, kalsium, magnesium, ammonium, tetraalkylammonium, og liknende, og når forbindelsen inneholder en basisk funksjonalitet, salter av ikke-toksiske 25 organiske eller uorganiske syrer, slik som hydroklorid, hydrobromid, tartrat, mesylat, acetat, maleat, oksalat, og liknende. Betegnelsen "farmasøytisk aksepterbart kation" refererer til et aksepterbart kationisk motion av en sur funksjonell gruppe. Slike kationer er eksemplifisert ved natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium-, ammonium-, tetraalkylammonium-kationer og liknende.

30

"Farmasøytisk aksepterbart vehikkel" refererer til et fortynningsmiddel, adjuvans, eksipiens eller bærer hvormed en forbindelse ifølge oppfinnelsen administreres.

35 "Prodruger" refererer til forbindelser som inkluderer derivater av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, som har spaltbare grupper, og som ved solvolysis under fysiologiske betingelser blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen som er farmasøytisk aktiv in vivo.

Slike eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, cholinesterderivater og liknende, N-alkylmorfolinestere og liknende.

5 "Solvat" refererer til former av forbindelsene som er assosiert med et løsningsmiddel, vanligvis ved en solvolysereaksjon. Denne fysiske assosiering inkluderer hydrogenbinding. Konvensjonelle løsningsmidler inkluderer vann, etanol, eddiksyre og liknende. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. fremstilles i krystallinsk form, og kan solvateres eller hydratiseres. Passende solvater inkluderer farmasøytisk aksepterbare solvater slik som hydrater, og inkluderer videre både støkiometriske
10 solvater og ikke-støkiometriske solvater. I bestemte tilfeller vil solvatet kunne isoleres, f.eks. når ett eller flere løsningsmiddel molekyler er innlemmet i krystallgitteret til det krystallinske faststoffet. "Solvat" omfatter både oppløsningsfase og isolerbare solvater. Representative solvater inkluderer hydrater, etanolater og metanolater.

15 "Individ" inkluderer mennesker. Betegnelsene "human", "pasient" og individ er anvendt omvekslende her.

"Terapeutisk effektiv mengde" betyr den mengden av en forbindelse som, når
20 administrert til et individ for behandling av en sykdom, er tilstrekkelig til å bevirke slik behandling for sykdommen. Den "terapeutisk effektive mengde" kan variere avhengig av forbindelsen, sykdommen og dens alvorlighet, og alder, vekt, osv., av individet som skal behandles.

25 "Forebygge" eller "forebygging" refererer til en reduksjon av risiko for å få eller utvikle en sykdom eller lidelse (dvs. bevirke at minst ett av sykdommens kliniske symptomer ikke utvikler seg i et individ som kan være eksponert for et middel som forårsaker sykdom, eller som er predisponert for sykdommen før inntreden av sykdommen).

30 Betegnelsen "profylakse" er relatert til "forebygging", og refererer til et mål eller prosedyre for formålet som er å forebygge heller enn å behandle eller helbrede en sykdom. Ikke-begrensede eksempler på profylaktiske mål kan inkludere administrering av vaksiner, administrering av heparin med lav molekylvekt til hospitaliserte pasienter med en risiko for trombose som f.eks. skyldes immobilisering,
35 og administrering av et anti-malariamiddel slik som klorokin før besøk til et geografisk område hvor malaria er endemisk eller hvor risikoen for å komme i kontakt med malaria er høy.

"Behandle" eller "behandling" av en hvilken som helst sykdom eller lidelse refererer, i
 én utførelsesform, til å forbedre sykdommen eller lidelsen (dvs. stanse sykdommen
 eller redusere manifestasjonen, omfang eller alvorlighet av minst ett av de kliniske
 symptomer derpå). I en annen utførelsesform refererer "behandle" eller "behandling"
 til å forbedre minst én fysisk parameter som eventuelt ikke er oppdaget av individet. I
 en ytterligere utførelsesform refererer "behandle" eller "behandling" til å modulere
 sykdommen eller lidelsen, enten fysisk (f.eks. stabilisering av et merkbart symptom),
 fysiologisk (f.eks. stabilisering av en fysisk parameter), eller begge. I en ytterligere
 utførelsesform relaterer "behandle" eller "behandling" til å nedsette sykdoms-
 progresjonen.

Som anvendt heri refererer betegnelsen "tilstand(er) som involverer inflammasjon" til
 gruppen av tilstander som inkluderer reumatoid artritt, osteoartritt, juvenil idiopatisk
 artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), inflammatoriske
 tarmsykdommer (f.eks. Crohns sykdom, kolitt), endotoksindrevne sykdomstilstander
 (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som
 bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og relaterte sykdommer som involverer brusk, slik
 som i forbindelse med ledd. Betegnelsen refererer særlig til reumatoid artritt,
 osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og inflammatoriske
 tarmsykdommer.

Som anvendt her anvendes betegnelsen "tilstand(er) som involverer en
 immunrespons" eller "autoimmune sykdommer" om hverandre, og refererer til
 gruppen av sykdommer som inkluderer obstruktive luftveissykdommer som inkluderer
 tilstander slik som COPD, astma (f.eks. intrinsisk astma, ekstrinsisk astma, støvastma,
 infantil astma), særlig kronisk eller "inngrodd" astma (f.eks. sen astma og luftveis-
 hyperresponderbarhet), bronkitt, som inkluderer bronkial astma, systemisk lupus
 erytematosus (SLE), multippel sklerose, type I diabetes mellitus, og komplikasjoner
 assosiert dermed, atopisk eksem (atopisk dermatitt), kontaktdermatitt og ytterligere
 eksematøs dermatitt, inflammatorisk tarmsykdom (f.eks. Crohns sykdom og ulcerøs
 kolitt), aterosklerose og amyotrof lateral sklerose. Betegnelsen refererer særlig til
 COPD, astma, systemisk lupus erytematosus, type I diabetes mellitus og
 inflammatorisk tarmsykdom.

35

Som anvendt her refererer betegnelsen "transplantasjonsavstøtning" til akutt eller
 kronisk avstøtning av celler, vev eller fast organ allo- eller -xenografts av f.eks.

pankreasøyer, stamceller, benmarg, hud, muskel, korneavev, nervevev, hjerte, lunge, kombinert hjerte-lunge, nyre, lever, tarm, pankreas, trakea eller spiserør, eller graft-versus-host sykdommer.

- 5 Som anvendt her refererer betegnelsen "proliferativ sykdom/sykdommer" til tilstander slik som cancer (f.eks. uterin leiomyosarkom eller prostatacancer), myeloproliferative lidelser (f.eks. polycytemi vera, essensiell trombocytose og myelofibrose), leukemi (f.eks. akutt myeloid leukemi og akutt lymfoblastisk leukemi), multippel myelom, psoriasis, restenose, sklerodermitt eller fibrose. Betegnelsen
10 refererer særlig til cancer, leukemi, multippel myelom og psoriasis.

- Som anvendt her refererer betegnelsen "cancer" til en malign eller benign vekst av celler i hud eller i kroppsorganer, f.eks., men uten begrensning, brusk, prostata, lunge, nyre, pankreas, mage eller tarm. En cancer har tendens til å infiltrere inn i
15 nærliggende vev og spre (metastasere) til fjerne organer, f.eks. til ben, lever, lunge eller hjernen. Som anvendt her inkluderer betegnelsen cancer både metastatiske tumorcelletyper, slik som, men ikke begrenset til, melanom, lymfom, leukemi, fibrosarkom, rabdomyosarkom og mastocytom, og typer av vevskarsinom, slik som, men ikke begrenset til, kolorektal cancer, prostatacancer, småcellet lungecancer og
20 ikke-småcellet lungecancer, brystcancer, pankreascancer, blærecancer, renal cancer, gastrisk cancer, glioblastom, primær levercancer, ovariecancer, prostatacancer og uterin leiomyosarkom.

- Som anvendt her refererer betegnelsen "leukemi" til neoplastiske sykdommer i blodet, og bloddannende organer. Slike sykdommer kan føre til dysfunksjon av benmarg og
25 immunsystem som gjør verten svært mottakelig for infeksjon og blødning. Betegnelsen leukemi refererer særlig til akutt myeloid leukemi (AML) og akutt lymfoblastisk leukemi (ALL).

- 30 Som anvendt her inkluderer betegnelsen "sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover" og spesifikt "sykdommer som involverer anabol stimulering av chondrocytter" tilstander slik som osteoartritt, psoriatisk artritt, juvenil reumatoid artritt, podagraartritt, septisk eller infeksiøs artritt, reaktiv artritt, refleksdystrofi, algodystrofi, Tietze syndrom eller kostal chondritt, fibromyalgi, osteochondritt,
35 neurogen eller neuropatisk artritt, artropati, endemiske former av artrittliknende osteoartritt deformans endemica, Mseleni sykdom og Handigodu sykdom;

degenerering resulterende fra fibromyalgi, systemisk lupus erytematosus, skleroderma og ankyloserende spondylitt.

5 Som anvendt her inkluderer betegnelsen "misdannelse(r) av kongenital brusk" tilstander slik som arvelig chondrolyse, chondrodysplasier og pseudochondrodysplasier, særlig, men uten begrensning, mikrotia, anotia, metafyseal chondrodysplasi, og relaterte lidelser.

10 Som anvendt her inkluderer betegnelsen "sykdom/sykdommer assosiert med hypersekresjon av IL6" tilstander slik som Castlemans sykdom, multippel myelom, psoriasis, Kaposis sarkom og/eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.

15 "Forbindelse(r) ifølge oppfinnelsen" og ekvivalente uttrykk er ment til å omfatte forbindelser med formelen VIa som beskrevet i det foregående, og viss uttrykk inkluderer farmasøytisk aksepterbare salter og solvater, f.eks. hydrater og solvatene av de farmasøytisk aksepterbare salter hvor sammenhengen tillater dette. Likeledes skal henvisning til mellomprodukter, enten de som sådan er patentsøkt eller ikke, er ment til å omfatte deres salter og solvater, hvor sammenhengen tillater dette.

20 Når områder er omtalt heri, bør angivelsen av et område betraktes til å representere hvert medlem av nevnte område.

Andre derivater av forbindelsen ifølge oppfinnelsen har aktivitet både i deres syreform og syrederivatform, men i den syresensitive formen får man ofte fordeler med
25 oppløselighet, vevskompatibilitet eller utsatt frigivelse i pattedyrorganismen (se Bundgard, H., Design of Prodrugs, sidene 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Prodruger inkluderer syrederivater som er vel kjent for de som utøver denne teknikk, slik som f.eks. estere fremstilt ved reaksjon av modersyren med en passende alkohol, eller amider fremstilt ved reaksjon av modersyreforbindelsen med et substituert eller
30 usubstituert amin, eller syreanhydrider, eller blandede anhydrider. Enkle alifatiske eller aromatiske estere, amider og anhydrider avledet fra sure grupper som henger på forbindelsene ifølge oppfinnelsen er særlig anvendbare prodruger. I noen tilfeller er det ønskelig å fremstille dobbel estertype prodruger slik som (acyloksy)alkylestere eller ((alkoksykarbonyl)oksy)alkylestere. Slike prodruger er særlig C₁-C₈-alkyl, C₂-C₈-
35 alkenyl, aryl, C₇-C₁₂ substituert aryl og C₇-C₁₂-aralkylestere av forbindelsene ifølge oppfinnelsen.

Som anvendt her refererer betegnelsen "isotopisk variant" til en forbindelse som inneholder unaturlige andeler av isotoper i ett eller flere av atomene som utgjør en slik forbindelse. En "isotop variant" av en forbindelse kan f.eks. inneholde én eller flere ikke-radioaktive isotoper slik som f.eks. deuterium (^2H eller D), karbon-13 (^{13}C),
5 nitrogen-15 (^{15}N) eller liknende. Det vil forstås at i en forbindelse hvor slik isotopsubstituering gjøres, kan de etterfølgende atomer, hvor tilstede, variere slik at f.eks. et hvilket som helst hydrogen kan være $^2\text{H}/\text{D}$, et hvilket som helst karbon kan være ^{13}C eller et hvilket som helst nitrogen kan være ^{15}N , og at tilstedeværelsen og erstatningen av slike atomer kan bestemmes innenfor fagkunnskapen på området.
10 Likeledes kan oppfinnelsen inkludere fremstillingen av isotope varianter med radioisotoper, i det tilfellet hvor f.eks. de resulterende forbindelser kan anvendes for legemiddel og/eller substrat-vevsfordelingsstudier. De radioaktive isotoper tritium, dvs. ^3H og karbon-14, dvs. ^{14}C , er særlig anvendbare for dette formål, på grunn av at de er enkle å innlemme og tilgjengelige midler for deteksjon. Videre kan forbindelser
15 fremstilles som er substituert med positronemitterende isotoper, slik som ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O og ^{13}N , og vil være anvendbare i "Positron Emission Topography" (PET) studier for å undersøke substratreseptorokkupasjon.

Alle isotope varianter av forbindelsene tilveiebrakt her, enten radioaktiv eller ikke, skal
20 være omfattet av oppfinnelsens ramme.

Det skal også forstås at forbindelser som har den samme molekylformen, men som avviker i natur eller sekvens av binding av deres atomer eller oppstilling av deres atomer i rommet, betegnes "isomerer". Isomerer som avviker i sammenstillingen av
25 deres atomer i rommet betegnes "stereoisomerer".

Stereoisomerer som ikke er speilbilder av hverandre betegnes "diastereomerer", og dem som er speilbilder som ikke kan legges oppå hverandre betegnes "enantiomerer". Når en forbindelse f.eks. har et asymmetrisk senter, er det bundet til fire forskjellige
30 grupper, og et par av enantiomerer er mulig. En enantiomer kan være kjennetegnet ved den absolutte konfigurasjon og dens asymmetriske senter og er beskrevet ved R- og S-sekvenseringsreglene til Cahn og Prelog eller ved måten hvorved molekylet roterer planet av polarisert lys, og betegnes som høyredreieende eller venstredreieende (dvs. henholdsvis som (+) eller (-)-isomerer). En kiral forbindelse kan eksistere som
35 enten individuell enantiomer eller som en blanding derav. En blanding som inneholder like andeler av enantiomerer betegnes en "racemisk blanding".

“Tautomerer” refererer til forbindelser som er byttbare former av en spesiell forbindelsesstruktur, og som varierer ved erstatningen av hydrogenatomer og elektroner. To strukturer kan således være likevekt gjennom bevegelsen av π elektroner og et atom (vanligvis H). Enoler og ketoner er f.eks. tautomerer fordi de raskt interkonverteres ved behandling med enten syre eller base. Et annet eksempel på tautomerisme er aci- og nitroformene av fenylnitrometan, som likeledes dannes ved behandling med syre eller base.

Tautomere former kan være relevante for oppnåelse av optimal kjemisk reaktivitet og biologisk aktivitet for en forbindelse av interesse.

Forbindelsene ifølge denne forbindelse kan ha ett eller flere asymmetriske sentre, idet slike forbindelser derfor kan fremstilles som individuelle (R)- eller (S)-stereoisomerer, eller som blandinger derav.

Dersom annet ikke er indikert, skal beskrivelsen eller navngiving av en spesiell forbindelse i beskrivelsen og kravene inkludere både individuelle enantiomere blandinger, racemiske eller på annen måte derav. Metodene for å bestemme stereokjemi og separasjon av stereoisomerer er vel kjent innen teknikkens stand.

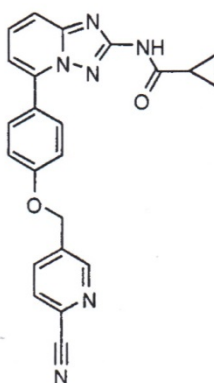
20

Forbindelsene

Den foreliggende oppfinnelse er basert på det funn at inhibitorer av JAK er anvendbare for behandling av sykdommer, som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledddegradering, f.eks. osteoartritt, og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergiske luftveissykdommer (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer anabol stimulering av chondrocytter), misdannelser av kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6 og transplantasjonsavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK kan også anvendes i behandling av proliferative sykdommer. Særlig kan inhibitorer av JAK anvendes i behandling av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). Spesielt i sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledddegradering og/eller inflammasjon, f.eks. osteoartritt. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for

fremstilling av disse forbindelser, farmasøytiske preparater som omfatter disse forbindelser, og fremgangsmåter for å behandle sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, og/eller inflammasjon ved administrering av en forbindelse ifølge oppfinnelsen. Forbindelsene kan være
 5 inhibitorer av ett eller flere medlemmer av JAK-familien, idet de særlig kan inhibere aktiviteten av én eller flere av JAK1, JAK2, JAK3 og/eller TYK2.

I henhold til et første aspekt av oppfinnelsen er det følgelig tilveiebrakt en forbindelse ifølge formel VIa:



VIa

10

I én utførelsesform er forbindelsen ifølge oppfinnelsen ikke en isotop variant.

I én utførelsesform, med hensyn til formel VIa, er forbindelsen forbindelse 176 fra
 15 tabell 1.

I visse aspekter tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse prodruger og derivater av forbindelsene ifølge formel VIa ovenfor. Prodruger er derivater av forbindelsen ifølge oppfinnelsen som har metabolsk spaltbare grupper og som blir, ved solvolyse eller
 20 under fysiologiske betingelser, forbindelsene ifølge oppfinnelsen som er farmasøytisk aktive in vivo. Slike eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til, cholinester-derivater og liknende, N-alkylmorfolinestere og liknende.

Andre derivater av forbindelsene ifølge oppfinnelsen har aktivitet i både deres
 25 syreformer og syrederivatformer, men den syresensitive formen gir ofte fordeler med hensyn til oppløselighet, vevskompatibilitet eller utsatt frigivelse i pattedyrorganismen (se Bundgard, H., Design of Prodrugs, sidene 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Prodruger inkluderer syrederivater som er velkjent for fagkyndige på området, slik

som f.eks. estere fremstilt ved reaksjonen av modersyren med en passende alkohol, eller amider fremstilt ved reaksjonen av modersyreforbindelsen med et substituert eller usubstituert amin, eller syreanhydrider, eller blandede anhydrider. Enkle alifatiske eller aromatiske estere, amider og anhydrider avledet fra syregrupper som henger på forbindelsene ifølge oppfinnelsen er foretrukne prodruger. I noen tilfeller er det ønskelig å fremstille prodruger av dobbel estertype, slik som (acyloksy)alkylester eller ((alkoksykarbonyl)oksy)alkylestere. Særlig anvendbare er C₁-C₈-alkyl, C₂-C₈-alkenyl, aryl, C₇-C₁₂ substituert aryl, og C₇-C₁₂-arylalkylestere av forbindelsene ifølge oppfinnelsen.

10

Farmasøytiske preparater

Når anvendt som farmasøytika, administreres forbindelsene ifølge oppfinnelsen typisk i form av et farmasøytisk preparat. Slike preparater kan fremstilles på en måte som er velkjent innen det farmasøytiske området, og omfatter minst én aktiv forbindelse. Generelt administreres forbindelsene ifølge oppfinnelsen i en farmasøytisk effektiv mengde. Mengden av forbindelsen som i realiteten administreres vil typisk bestemmes av en lege sett på bakgrunn av de relevante forhold som inkluderer den tilstand som skal behandles, ruten som velges for administrering, den aktuelle forbindelsen som administreres, alder, vekt og respons hos den individuelle pasient, alvorligheten av pasientens symptomer og liknende.

20

De farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan administreres ved en rekke ruter som inkluderer oral, rektal, transdermal, subkutan, intraartikulær, intravenøs, intramuskulær og intranasal. Avhengig av den tiltenkte avleveringsruten, blir forbindelsene ifølge oppfinnelsen foretrukket formulert som enten injiserbare eller orale preparater, eller som salver, lotioner, eller som plastre, alle for transdermal administrering.

25

Preparatene for oral administrering kan være i form av en flytende bulkoppløsning eller bulksuspensjoner, eller bulkpulvere. Mer vanlig er imidlertid preparatene presentert i enhetsdoseformer for enkel nøyaktig dosering. Betegnelsen "enhetsdoseformer" refererer til fysisk adskilte enheter som er egnet som enhetsdoseringer for mennesker og andre pattedyr, hvor hver enhet inneholder en forhåndsbestemt mengde aktivt materiale som er beregnet til å produsere den ønskede terapeutiske effekt, sammen med en passende farmasøytisk eksipiens, vehikkel eller bærer. Typiske enhetsdoseringsformer inkluderer pre-fylte, pre-målte ampuller eller sprøyter av de flytende preparater, tabletter, kapsler eller liknende i

35

tilfellet av faste preparater. I slike preparater er den aktive forbindelsen vanligvis en mindre komponent (fra omtrent 0,1 til omtrent 50 vekt%, eller foretrukket fra omtrent 1 til omtrent 40 vekt%) hvor resten er forskjellige vehikler eller bærere, og prosesseringshjelpstoffer som understøtter forming av den ønskede doseringsformen.

5

Flytende former egnet for oral administrering kan inkludere en passende vandig eller ikke-vandig vehikkel med buffere, suspensjonsmidler og dispergeringsmidler, fargestoffer, smaksstoffer og liknende. Faste former kan f.eks. inkludere de etterfølgende ingredienser, eller forbindelser av en tilsvarende natur: et bindemiddel slik som mikrokrySTALLinsk cellulose, tragakantgummi eller gelatin; en eksipiens slik som stivelse eller laktose, et desintegrerende middel slik som alginsyre, Primogel eller maisstivelse; et smøremiddel slik som magnesiumstearat; et glidemiddel slik som kolloidal silisiumdioksid; et søtningsstoff slik som sukrose eller sakkarin; eller et smaksmiddel slik som peppermynte, metylsalicylat eller appelsinsmak.

15

Injiserbare preparater er typisk basert på injiserbar steril saltoppløsning eller fosfatbufret saltoppløsning, eller andre injiserbare bærere som er kjent innen teknikken. Som før er den aktive forbindelsen i slike preparater typisk en mindre komponent, og er ofte fra omtrent 0,05 til 10 vekt%, hvor resten er den injiserbare bærer og liknende.

20

Transdermale preparater er typisk formulert som en topisk salve eller krem som inneholder den eller de aktive bestanddelene, generelt i en mengde som strekker seg fra omtrent 0,01 til omtrent 20 vekt%, foretrukket fra omtrent 0,1 til omtrent 20 vekt%, foretrukket fra omtrent 0,1 til omtrent 10 vekt%, og mer foretrukket fra omtrent 0,5 til omtrent 15 vekt%. Når formulert som en salve, vil de aktive bestanddeler typisk kombineres med enten en parafinisk eller en vannblandbar salvebasis. Alternativt kan de aktive bestanddeler formuleres i en krem med f.eks. en olje-i-vann krembasis. Slike transdermale formuleringer er velkjent innen teknikken, og inkluderer generelt ytterligere bestanddeler for å øke stabil hudpenetrering av de aktive bestanddelene eller av formuleringen. Alle slike kjente transdermale formuleringer og bestanddeler er inkludert innenfor rammen for denne oppfinnelse.

25

30

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan også administreres ved hjelp av en transdermal anordning. Følgelig kan transdermal administrering gjennomføres ved anvendelse av et plaster, enten av typen reservoar eller av typen porøs membran, eller av en fast matrikstype.

35

De overnevnte komponenter for oralt administrerbare, injiserbare eller topisk administrerbare preparater er kun representative. Andre materialer så vel som prosesseringsteknikker og liknende er angitt i del 8 av Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. utgave, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, som er innlemmet heri ved referanse.

Forbindelsene ifølge denne oppfinnelse kan også administreres i former med forsinket frigivelse eller fra legemiddelavleveringssystemer med forsinket frigivelse. En beskrivelse av representative materialer med forsinket frigivelse kan man finne i Remington's Pharmaceutical Sciences.

De etterfølgende formuleringseksempler illustrerer representative farmasøytiske preparater som kan fremstilles i overensstemmelse med denne oppfinnelse. Den foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset til de etterfølgende farmasøytiske preparater.

Formulering 1 – tabletter

En forbindelse ifølge oppfinnelsen kan blandes, som et tørt pulver, med et tørt gelatinbindemiddel i et omtrentlig 1:2 vektforhold. En mindre mengde magnesiumstearat tilsettes som et smøremiddel. Blandingen formes til 240-270 mg tabletter (80-90 mg av aktiv amidforbindelse pr. tablett) i en tablettpresse.

Formulering 2 – kapsler

En forbindelse ifølge oppfinnelsen kan blandes som et tørt pulver med et stivelsesfortynningsmiddel i et omtrentlig 1:1 vektforhold. Blandingen kan fylles i 250 mg kapsler (125 mg av aktiv amidforbindelse pr. kapsel).

Formulering 3 – væske

En forbindelse ifølge oppfinnelsen (125 mg), kan blandes med sukrose (1,75 g) og xantangummi (4 mg), og den oppnådde blanding kan blandes, passeres gjennom en nr. 10 mesh U.S. sikt, og deretter blandes med en på forhånd fremstilt oppløsning av mikrokrySTALLinsk cellulose og natriumkarboksymetylcellulose (11:89, 50 mg) i vann. Natriumbenzoat (10 mg), smaksstoff og farge er fortynnet med vann, og tilsettes med omrøring. Tilstrekkelig vann kan deretter tilsettes med omrøring. Tilstrekkelig vann tilsettes deretter for å fremstille et totalt volum på 5 ml.

Formulering 4 – tabletter

En forbindelse ifølge oppfinnelsen kan blandes som et tørt pulver med et tørt gelatinbindemiddel i et omtrentlig 1:2 vektforhold. En mindre mengde magnesiumstearat tilsettes som et smøremiddel. Blandingen formes til 450-900 mg tabletter (150-300 mg aktiv amidforbindelse) i en tablettpresse.

Formulering 5 – injeksjon

En forbindelse ifølge oppfinnelsen kan oppløses eller suspenderes i et injiserbart vandig medium av bufret sterilt saltvann til en konsentrasjon på omtrent 5 mg/ml.

Formulering 6 – topisk

Stearylalkohol (250 g) og hvit petrolatum (250 g) smeltes ved omtrent 75°C, og deretter blir en blanding av en forbindelse ifølge oppfinnelsen (50 g), metylparaben (0,25 g), propylparaben (0,15 g), natriumlaurylsulfat (10 g), og propylenglykol (120 g) oppløst i vann (omtrent 370 g) tilsatt, og den oppnådde blanding omrøres inntil den stivner.

Metoder for behandling

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan anvendes som terapeutiske midler for behandling av tilstander i pattedyr som årsaksmessig er relatert til, eller skyldes avvikende aktivitet av JAK. Særlige tilstander relatert til avvikende aktivitet av én eller flere av JAK1, JAK2, JAK3 og/eller TYK2. Forbindelsen ifølge oppfinnelsen og farmasøytiske preparater ifølge denne oppfinnelse kan følgelig anvendes som terapeutika for å forebygge og/eller behandle sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabolske stimulering av chondrocytter), misdannelser av kongenital brusk, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og transplantasjonsavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning). Inhibitorer av JAK kan også anvendes i behandling av proliferative sykdommer. Særlig kan inhibitorer av JAK anvendes i behandling av cancer, særlig leukemier og faste tumorer (f.eks. uterin leiomyosarkom, prostatacancer). Tilstandene er særlig valgt fra inflammatoriske tilstander, tilstander

som er relatert til brusk- og/eller ledd-degradering i pattedyr, som inkluderer mennesker. I en annen utførelsesform kan forbindelsene og de farmasøytiske preparater ifølge denne oppfinnelse anvendes som terapeutika for å forebygge og/eller behandle proliferative lidelser i pattedyr, som inkluderer mennesker. I en spesifikk utførelsesform kan forbindelsen ifølge oppfinnelsen og farmasøytiske preparater derav anvendes som terapeutika for å forebygge og/eller behandle cancer i pattedyr som inkluderer mennesker.

I ytterligere aspekter av behandlingsmetoder er der omtalt metoder for å behandle et pattedyr som er tilbøyelig til, eller er rammet av, en tilstand som involverer en immunrespons eller en autoimmun sykdom. Metodene omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser ifølge oppfinnelsen som beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform er den autoimmune sykdom valgt fra COPD, astma, systemisk lupus erytematosus, type I diabetes mellitus og inflammatorisk tarmsykdom.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av en tilstand som involverer en autoimmun respons for en autoimmun sykdom. I en spesifikk utførelsesform er den autoimmune sykdom valgt fra COPD, astma, systemisk lupus erytematosus, type I diabetes mellitus og inflammatorisk tarmsykdom.

I et behandlingsmetodeaspekt, er der omtalt en metode for behandling, forebygging eller profylakse i et pattedyr som er tilbøyelig til eller som er rammet av sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. en tilstand forbundet med, eller sykdommer som involverer anabol stimulering av chondrocytter), f.eks. osteoartritt, psoriatisk artritt, juvenil reumatoid artritt, podagraartritt, septisk eller infeksiøs artritt, reaktiv artritt, refleks sympatisk dystrofi, alkodystrofi, Tietze syndrom eller kostal chondritt, fibromyalgi, osteochondritt, neurogen eller neuropatisk artritt, artropati, endemiske former av artritt slik som osteoarthritis deformans endemica, Mseleni sykdom og Handigodu sykdom; degenerering resulterende fra fibromyalgi, systemisk lupus erytematosus, sklerodermi og ankyloserende spondylitt, hvilken metode omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse

ifølge oppfinnelsen, eller én eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser beskrevet her.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med
 5 formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av
 det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging
 eller profylakse av sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. en
 tilstand assosiert med, eller sykdommer som involverer anabol stimulering av
 chondrocytter), f.eks. osteoartritt, psoriatisk artritt, juvenil reumatoid artritt,
 10 podagraartritt, septisk eller infeksjøs artritt, reaktiv artritt, refleks sympatisk dystrofi,
 algodystrofi, Tietze syndrom eller kostal chondritt, fibromyalgi, osteochondritt,
 neurogen eller neuropatisk artritt, artropati, endemiske former av artritt slik som
 osteoartritt, deformans endemica, Mseleni sykdom og Handigodu sykdom;
 degenerering som resulterer fra fibromyalgi, systemisk lupus erytematosus,
 15 sklerodermi og ankyloserende spondylitt.

Der er også beskrevet en metode for behandling av misdannelser av kongenital brusk
 som inkluderer arvelig chondrolyse, chondrodysplasier og pseudo chondrodysplasier,
 særlig, men uten begrensning, mikotia, anotia, metafyseal chondrodysplasi og
 20 relaterte lidelser, hvilke metoder omfatter administrering av en effektiv mengde av ett
 eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser som beskrevet her.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med
 formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av
 25 det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging
 eller profylakse av misdannelser av kongenital brusk, som inkluderer arvelig
 chondrolyse, chondrodysplasier og pseudo chondrodysplasier, særlig, men uten
 begrensning, mikrotia, anotia, metafyseal chondrodysplasi, og relaterte lidelser.

I et annet aspekt er det omtalt en metode for å behandle et pattedyr som er tilbøyelig
 til eller som er rammet av en tilstand som involverer inflammasjon. I en ytterligere
 metode for behandlingsaspekter er det omtalt metoder for å behandle et pattedyr som
 er tilbøyelig til eller som er rammet av sykdommer og lidelser som er mediert ved,
 eller resulterer i inflammasjon, slik som f.eks. reumatoid artritt og osteoartritt,
 35 allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt,
 inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks.
 komplikasjoner etter bypassingrep eller kronisk endotoksintilstander som bidrar til

- f.eks. kronisk hjertesvikt), og relaterte sykdommer som involverer brusk, slik som det i leddene, hvilken metode omfatter administrering av en effektiv mengde av én eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser her beskrevet. I et spesifikt aspekt er tilstanden som involverer inflammasjon valgt fra reumatoid artritt, osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og inflammatoriske tarmsykdommer. Metodene omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser beskrevet her.
- I et annet aspekt tilveiebringer denne oppfinnelsen en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av en tilstand som involverer informasjon. I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en forbindelse ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av sykdommer og lidelser som er medierte ved, eller resulterer i, inflammasjon slik som f.eks. reumatoid artritt og osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og relaterte sykdommer som involverer brusk, slik som den i leddene. I en spesifikk utførelsesform er tilstanden som involverer inflammasjon valgt fra reumatoid artritt, osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og inflammatoriske tarmsykdommer.
- I en ytterligere metode for behandlingsaspekter er det omtalt metoder for å behandle et pattedyr som er tilbøyelig til, eller som er rammet av en proliferativ sykdom, særlig cancer (f.eks. faste tumorer slik som uterin leiomyosarkom eller prostatacancer), leukemi (f.eks. AML eller ALL), multippel myelom og/eller psoriasis, hvilken metode omfatter administrering av en effektiv mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser her beskrevet. I ytterligere metoder for behandlingsaspekter er det omtalt metoder for å behandle et pattedyr som er tilbøyelig til eller rammet av cancer (f.eks. faste tumorer slik som uterin leiomyosarkom eller prostatacancer) og/eller leukemier.
- I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av et farmasøytisk aksepterbart salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging eller

profylakse av en proliferativ sykdom, særlig cancer (f.eks. faste tumorer, slik som
uterin leiomyosarkom eller prostatacancer), leukemier (f.eks. AML eller ALL),
multippel myelom og/eller psoriasis. I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende
oppfinnelse en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller
5 solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for
anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av cancer (f.eks. faste tumorer
slik som uterin leiomyosarkom eller prostatacancer) og/eller leukemier.

I en ytterligere metode for behandlingsaspekter er det omtalt metoder for å behandle
10 et pattedyr som er tilbøyelig til eller rammet av sykdommer forbundet med
hypersekresjon av IL6, særlig Castlemans sykdom eller mesangial proliferativ
glomerulonefritt, hvilke metoder omfatter administrering av en effektiv mengde av ett
eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelser beskrevet her.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med
15 formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av
det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging
eller profylakse av sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, særlig
Castlemans sykdom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.

I en ytterligere metode for behandlingsaspekter er det omtalt metoder for å behandle
20 et pattedyr som er tilbøyelig til eller rammet av transplantasjonsavstøtning, hvilken
metode omfatter administrering av en effektiv mengde av ett eller flere av de
farmasøytiske preparater eller forbindelser beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform
er det omtalt metoder for å behandle organtransplantatavstøtning.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en forbindelse med
formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av
det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for anvendelse i behandling, forebygging
30 eller profylakse av transplantatavstøtning. I et spesifikt aspekt er der omtalt metoder
for å behandle organtransplantatavstøtning.

Som et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er der tilveiebrakt en forbindelse med
formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat eller
35 farmasøytisk aksepterbart salt derav, for anvendelse som et farmasøytika, særlig i
behandling eller forebygging av de ovenfor nevnte tilstander og sykdommer. Også
tilveiebrakt her er anvendelsen av en forbindelse med formel VIa, eller et farmasøytisk

aksepterbart salt eller solvat derav, eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, for fremstilling av et medikament for behandling eller forebygging av én eller flere av de ovenfor nevnte tilstander og sykdommer.

5 Et spesielt regime av den foreliggende metode omfatter administrering til et individ som lider av en sykdom som involverer inflammasjon, av en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å redusere inflammasjonsnivået i pasienten, og foretrukket terminere prosessene som er ansvarlig for nevnte inflammasjon. En spesiell utførelsesform av metoden omfatter
10 administrering av en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen til en individpasient som lider av eller som er tilbøyelig til utvikling av reumatoid artritt, i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å henholdsvis redusere eller forebygge inflammasjon i leddene til nevnte pasient, foretrukket terminere prosessene som er ansvarlig for nevnte inflammasjon.

15 Et ytterligere særlig regime ifølge foreliggende metode omfatter administrering til et individ som lider av en sykdomstilstand som er kjennetegnet ved brusk- eller leddegenerering (f.eks. osteoartritt) av en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å redusere, og foretrukket
20 terminere, de selv-fortsettende prosesser som er ansvarlige for nevnte degradering. En spesiell utførelsesform av metoden omfatter administrering av en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen til en pasient som lider av eller som er tilbøyelig til utvikling av osteoartritt, i en tidsperiode som er tilstrekkelig til henholdsvis å redusere eller forebygge bruskdegradering i ledd hos nevnte pasient og foretrukket
25 terminere de selv-fortsettende prosesser som er ansvarlig for nevnte degradering. I en særlig utførelsesform utviser nevnte forbindelser brusk-anabole og/eller anti-katabole egenskaper.

Injeksjonsdosenivåer varierer fra omtrent 0,1 mg/kg/time til minst 10 mg/kg/time, og
30 alle fra omtrent 1 til omtrent 120 timer, og særlig fra 24 til 96 timer. En forbelastningsbolus på fra omtrent 0,1 mg/kg til omtrent 10 mg/kg eller mer, kan også administreres for å oppnå adekvate "steady state" nivåer. Den maksimale totale dosen forventes ikke å overskride omtrent 2 g/døgn for en menneskepasient som er fra 40 til 80 kg.

35 For å forebygge og/eller behandle langtidstilstander, slik som degenerative tilstander, strekker behandlingsregimet seg vanligvis over mange måneder eller år, slik at orale

doseringer foretrukket for pasienten av bekvemmelighetshensyn og toleranse. Med oral dosering er én til fem, og særlig to til fire, og typisk tre, orale doser pr. dag representativt regime. Ved å anvende disse doseringsmønstre, tilveiebringer hver dose fra omtrent 0,01 til omtrent 20 mg/kg av forbindelsen ifølge oppfinnelsen, hvor hver spesielle dose tilveiebringer fra omtrent 0,1 til omtrent 10 mg/kg, og særlig omtrent 1 til omtrent 5 mg/kg.

Transdermale doser er generelt valgt for å tilveiebringe tilsvarende eller lavere blodnivåer enn det som oppnås ved å anvende injeksjonsdoser.

10

Når anvendt for å forebygge inntreden av en inflammatorisk tilstand, vil forbindelsen ifølge denne oppfinnelse administreres til en pasient med risiko for å utvikle tilstanden, typisk ifølge råd og under tilsyn av en lege, ved doseringsnivåer som beskrevet ovenfor. Pasienter med risiko for å utvikle en særlig tilstand inkluderer generelt dem som har en familiehistorie i forbindelse med tilstanden, eller dem som er blitt identifisert ved genetisk testing eller screening til å være særlig tilbøyelige til å utvikle denne tilstanden.

15

Forbindelsen ifølge denne oppfinnelsen kan administreres som det eneste aktive middel, eller de kan administreres i kombinasjon med andre midler som inkluderer andre forbindelser som viser samme eller en tilsvarende terapeutisk aktivitet, eller som er bestemt til å være sikre og effektive for slik kombinert administrering. I en spesifikk utførelsesform vil ko-administrering av to (eller flere) midler tillate signifikant lavere doser av hvert middel som anvendes, og reduserer dermed risikoen for bivirkninger.

20

25

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av en sykdom som involverer inflammasjon, og spesielle midler inkluderer, men er ikke begrenset til, immunregulerende midler, f.eks. azatioprin, kortikosteroider (f.eks. prednisolon eller deksametason), syklofosfamid, cyklosporin A, takrolimus, mykofenolat mofetil, muromonab-CD3 (OKT3, f.eks. Orthocolone®), ATG, aspirin, acetaminofen, ibuprofen, naproksen og piroksikam.

30

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av artritt (f.eks. reumatoid artritt), særlig midler som inkluderer men ikke er begrenset til analgetiske midler

35

ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAID'er), steroider, syntetiske DMARD'er (for eksempel, men uten begrensning, metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, auranofin, natrium-aurotiomalat, penicillamin, klorkin, hydroksyklorokin, azatioprin og cyklosporin), og biologiske DMARD'er (for eksempel, men uten
5 begrensning, infliximab, etanercept, adalimumab, rituximab og abatacept).

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av proliferative lidelser, og særlige midler inkluderer, men er ikke begrenset til, metotreksat, leukovorin,
10 adriamycin, prenison, bleomycin, syklofosfamid, 5-fluoruracil, paklitaxel, docetaxel, vinkristin, vinblastin, vinorelbin, doksorubicin, tamoksifen, toremifen, megestrol acetat, anastrozol, goserelin, anti-HER2 monoklonalt antistoff (f.eks. Herceptin™), kapecitabin, raloksifenhydroklorid, EGFR-inhibitorer (f.eks. Iressa (R), Tarceva(TM), Erbitux(TM)), VEGF-inhibitorer (f.eks. Avastin(TM)), proteasominhibitorer (f.eks.
15 Velcade(TM)), Glivec (R) eller hsp90-inhibitorer (f.eks. 17-AAG). I tillegg kan en forbindelse ifølge oppfinnelsen administreres i kombinasjon med andre terapier som inkluderer, men som ikke er begrenset til, radioterapi eller kirurgi. I en spesifikk utførelsesform er den proliferative lidelsen valgt fra cancer, myeproliferativ sykdom eller leukemier.

20

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av autoimmune sykdommer, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til, glukokortikoider, cytostatiske midler (f.eks. purinaloger), alkyleringsmidler (f.eks.
25 nitrogensennepegassderivater (syklofosfamid), nitrosoareforbindelser, platinaforbindelser, og andre), antimetabolitter (f.eks. metotreksat, azatioprin og merkaptopurin), cytotoxisk antibiotika (f.eks. daktinomycin, antrasykliner, mitomycin C, bleomycin og mitramycin), antistoffer (f.eks. anti-CD20, anti-CD25 eller anti-CD3 (OTK3) monoklonale antistoffer, Atgam® og Thymoglobuline®), cyklosporin,
30 takrolimus, rapamycin (sirolimus), interferoner (f.eks. IFN-β, TNF-bindingsproteiner (f.eks. infliximab (Remicade) etanercept (Enbrel), eller adalimumab (Humira)), mykofenolat, Fingolimod, Myriocin.

I én utførelsesform ko-administreres forbindelsen ifølge oppfinnelsen med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av transplantasjonsavstøtning, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til: kalsineurininhibitorer (f.eks. cyklosporin eller takrolimus (FK506)), mTOR-inhibitorer (f.eks. sirolimus,

35

everolimus), anti-proliferative midler (f.eks. azatioprin, mykofenolsyre),
 kortikosteroider (f.eks. prednisolon, hydrokortison), antistoffer (f.eks. monoklonale
 anti-IL-2R α -reseptorantistoffer, basiliximab, daclizumab), polyklonale anti-T-
 celleantistoffer (f.eks. anti-tymocytglobulin (ATG), anti-lymfocytglobulin (ALG)).

5

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet
 terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av astma og/eller rinitt og/eller
 COPD, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til: beta₂-
 adrenoceptoragonister (f.eks. salbutamil, levalbuterol, terbutalin og bitolterol),
 10 epinefrin (inhalert eller tabletter), anticholinerge midler (f.eks. ipratropumbromid),
 glukokortikoider (oralt eller inhalert), lengevirkende β_2 -agonister (f.eks. salmeterol,
 formoterol, bambuterol og oral albuterol med utsatt frigivelse), kombinasjoner av
 inhalerte steroider og lengevirkende bronkodilatorer (f.eks. flutikason/salmeterol,
 budesonid/formoterol), leukotrienantagonister og synteseinhibitorer (f.eks.
 15 montelukast, zafirlukast og zileuton), inhibitorer av mediatorfrigivelse (f.eks.
 kromoglykat og ketotifen), biologiske regulatorer av IgE-respons (f.eks. omalizumab),
 antihistaminer (f.eks. ceterizin, cinnarizin, fexofenadin), vasokonstriktorer (f.eks.
 oksymetazolin, xylometazolin, nafazolin og tramazolin).

20

I tillegg kan forbindelsen ifølge oppfinnelsen administreres i kombinasjon med
 kriseterapier for astma og/eller COPD, slik som terapier som inkluderer administrering
 av oksygen eller helioks, finfordelt salbutamol eller terbutalin (eventuelt kombinert
 med et anticholinergisk middel (f.eks. ipratropium), systemiske steroider (oralt eller
 intravenøst, f.eks. prednison, prednisolon, metylprednisolon, deksametason eller
 25 hydrokortison), intravenøs salbutamol, ikke-spesifikke beta-agonister, injisert eller
 inhalert (f.eks. epinefrin, isoetarin, isoproterenol, metaproterenol), anticholinergiske
 midler (IV eller finfordelt, f.eks. glykopyrrolat, atropin, ipratropium), metylxantiner
 (teofyllin, aminofyllin, bamifyllin), inhalasjonsanestetika, som har bronkodilerende
 effekt (f.eks. isofluran, halotan, enfluran), ketamin, intravenøst magnesiumsulfat.

30

I én utførelsesform ko-administreres forbindelsen ifølge oppfinnelsen med et annet
 terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av IBD, særlig midler som
 inkluderer, men som ikke er begrenset til: glukokortikoider (f.eks. prednison,
 budesonid), syntetiske sykdomsmodifiserende, immunmodulerende midler (f.eks.
 35 metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, mesalazin, azatioprin, 6-merkaptopurin og
 ciklosporin) og biologiske sykdomsmodifiserende, immunmodulerende midler
 (infliximab, adalimumab, rituximab og abatacept).

I én utførelsesform ko-administreres forbindelsen ifølge oppfinnelsen med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av SLE, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til: sykdomsmodifiserende antireumatiske legemidler (DMARD'er) slik som antimalariamidler (f.eks. plaquenil, hydroksyklorokin),
 5 immunsuppresjonsmidler (f.eks. metotreksat og azatioprin), syklofosfamid og mykofenolsyre; immunsuppresjonslegemidler og analgetiske midler slik som ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler, opiater (f.eks. dekstropopoksyfen og kodamol), opioider (f.eks. hydrokodon, oksykodon, MS Contin eller metadon) og
 10 fentanyl duragesic transdermalt plaster.

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av psoriasis, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til, topiske behandlinger slik som
 15 badeoppløsninger, fuktighetsbevarende midler, medisinske kremer og salver som inneholder kulltjære, ditranol (antralin), kortikosteroider slik som desoksimetason (Topicort), fluocinonid, vitamin D₃-analoger (for eksempel kalsipotriol), arganolje og retinoider (etretinat, acitretin, tazaroten), systemiske behandlinger slik som metotreksat, cyklosporin, retinoider, tioguanin, hydroksyurea, sulfasalazin,
 20 mykofenolat mofetil, azatioprin, takrolimus, fumarsyreestere eller biologiske midler slik som Amevive, Enbrel, Humira, Remicade, Raptiva og ustekinumab (en IL-12- og IL-23-blokker). I tillegg kan en forbindelse ifølge oppfinnelsen administreres i kombinasjon med andre terapier som inkluderer, men som ikke er begrenset til, fototerapi eller fotokjemoterapi (f.eks. psoralen og UVA fototerapi (PUVA)).

25 Ved ko-administrering er det inkludert hvilke som helst midler for avlevering av to eller flere terapeutiske midler til pasienten som en del av det samme behandlingsregimet, noe som vil fremgå klart for den fagkyndige på området. Om de to eller flere midlene kan administreres samtidig i en enkelt formulering er ikke
 30 vesentlig. Midlene kan administreres i forskjellige formuleringer, og på forskjellige tidspunkter.

Generelle synteseprosedyrer

Generelt

35 Forbindelsen med formel VIa eller et farmasøytisk aksepterbart salt eller solvat derav eller et solvat av det farmasøytisk aksepterbare salt derav, kan fremstilles fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer ved å anvende de etterfølgende generelle metoder og

prosedyrer. Det vil forstås at der hvor typiske foretrukne fremgangsmåtebetingelser (f.eks. reaksjonstemperaturer, tider, molforhold for reaktanter, løsningsmidler, trykk, osv.) er gitt, kan andre fremgangsmåtebetingelser også anvendes dersom annet ikke er angitt. Optimale reaksjonsbetingelser kan variere med de spesielle reaktanter eller løsningsmidler som anvendes, men slike betingelser kan bestemmes av en fagkyndig på området ved rutinemessige optimaliseringsprosedyrer.

I tillegg vil de fagkyndige på området forstå at konvensjonelle beskyttelsesgrupper kan være nødvendig for å forhindre at visse funksjonelle grupper gjennomgår uønskede reaksjoner. Valg av en passende beskyttelsesgruppe for en spesiell funksjonell gruppe så vel som passende betingelser for beskyttelse og avbeskyttelse, er vel kjent innen teknikken. En rekke beskyttelsesgrupper og deres introduksjon og fjerning er f.eks. beskrevet i T. W. Greene og P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, andre utgave, Wiley, New York, 1991, og referanser angitt der.

De etterfølgende metoder er presentert mer detaljert som fremstillingen av representative bisykloheteroaryler som er blitt angitt i det etterfølgende. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles fra kjente eller kommersielt tilgjengelige utgangsmaterialer og reagenser av en fagkyndig på området innen organisk syntese.

Alle reagenser er av kommersiell kvalitet, og ble anvendt som mottatt uten ytterligere rensing, dersom annet ikke er angitt. Kommersielt tilgjengelige vannfrie løsningsmidler ble anvendt for reaksjoner gjennomført under inerte atmosfærer. Løsningsmidler med reagenskvaliteter ble anvendt i alle tilfeller dersom annet ikke er angitt. Kolonnekromatografi ble gjennomført på silikagel 60 (35-70 μm). Tynnsjikt-kromatografi ble gjennomført ved å anvende forbelagt silikagel F-254-plater (tykkelse 0,25 mm). ^1H NMR spektra ble registrert på et Bruker DPX 400 NMR spektrometer (400 MHz). Kjemiske skift (δ) for ^1H NMR spektra er rapportert i deler pr. million (ppm) i forhold til tetrametylsilan (δ 0,00) eller en passende restløsningsmiddeltopp, dvs. CHCl_3 (δ 7,27), som intern referanse. Multiplisiteter er gitt som singlett (s), dublett (d), triplett (t), kvartett (q), multiplett (m) og bred (br). Koblingskonstanter (J) er gitt i Hz. Elektrospray MS-spektra ble oppnådd på et Micromass platform LC/MS-spektrometer. Kolonne anvendt for alle LCMS-analyser: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 mm ID x 50 mm L (del nr. 186002350)). Preparativ HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19 mm ID x 100 mm L (del nr.

186002978). Alle metoder anvender MeCN/H₂O-gradienten. H₂O inneholder enten 0,1 % TFA eller 0,1 % NH₃.

Liste over forkortelser anvendt i den eksperimentelle delen:

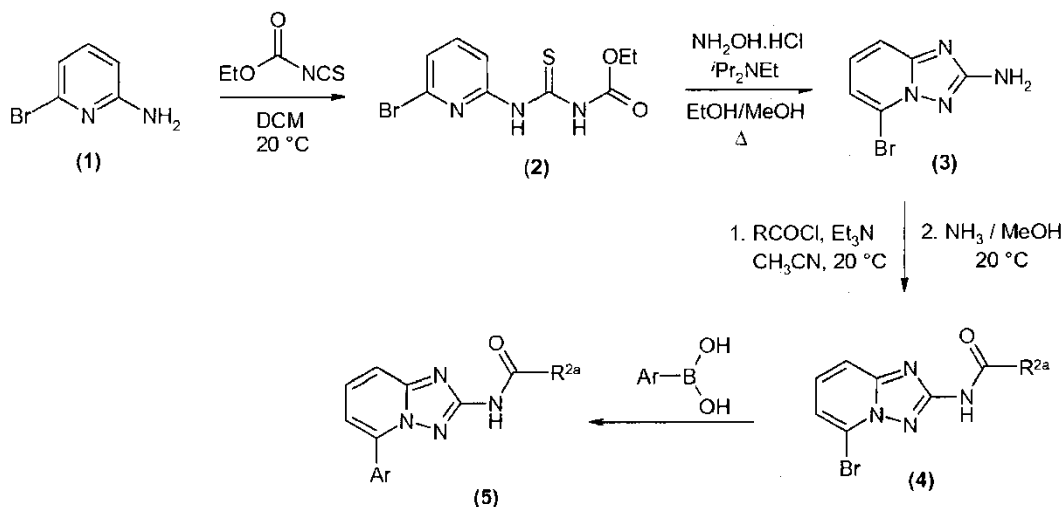
5	DCM	Diklormetan
	DiPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
	MeCN	Acetonitril
	BOC	<i>tert</i> -butyloksy-karbonyl
	DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
10	TFA	Trifluoreddiksyre
	THF	Tetrahydrofuran
	NMR	Nukleær magnetisk resonans
	DMSO	Dimetylsulfoksid
	DPPA	Difenylfosforylazid
15	LC-MS	Væskerkromatografi-massespektrometri
	Ppm	Deler pr. million
	EtOAc	Etylacetat
	APCI	Atmosfærisk trykk kjemisk ionisering
	Rt	Retensjonstid
20	s	Singlett
	br s	Bred singlett
	m	Multiplett
	d	Dublett
	PdCl ₂ dppf	[1,1'-Bis(difenylfosfin)ferrocen]diklorpalladium(II)
25	TEA	Trietylamin

Syntese for fremstilling av forbindelser med formel I og formel VIa

En forbindelse med formel I kan fremstilles i henhold til det etterfølgende skjema.

Generell syntesemetode

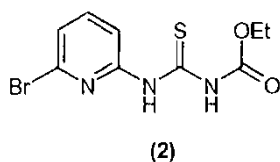
Skjema 1



hvor Ar er $\text{Cy1-L1-(CR}^{4b}\text{R}^{4c}\text{)}_{n1}\text{-R}^{3b}$; og Cy1, L1, n1, R^{2a} , R^{3b} , R^{4b} og R^{4c} er som beskrevet her.

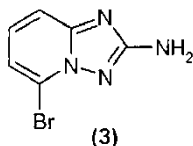
Generelt

1.1.1 1-(6-Bromo-pyridin-2-yl)-3-karboetoksy-tiourea (2)



Til en løsning av 2-amino-6-brompyridin **(1)** (253,8 g, 1,467 mol) i DCM (2,5 L) avkjølt til 5 °C blir det tilsatt etoksykarbonylisotiocyanat (173,0 ml, 1,467 mol) dråpevis over 15 min. Reaksjonsblandingen fikk deretter oppvarmes til romtemp. (20 °C) og ble omrørt i 16 timer. Inndampning *i vakuum* gir et fast stoff som kan oppsamles ved filtrering, grundig vasket med petrol (3 × 600 ml) og luft-tørket, hvilket gir **(2)**. Tiourinstoffet kan anvendes som sådan for neste trinn uten noen rensning. ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d, J 7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t, J 8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd, J 7,7 og 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q, J 7,1 Hz, CH_2), 1,35 (3H, t, J 7,1 Hz, CH_3).

1.1.2 5-Bromo-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-ylamine (3)

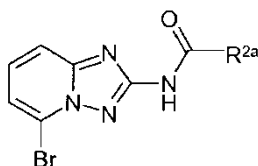


5

Til en suspensjon av hydroksylamin-hydroklorid (101,8 g, 1,465 mol) i EtOH/MeOH (1:1, 900 ml) blir det tilsatt *N,N*-diisopropyletylamin (145,3 ml, 0,879 mol) og blandingen blir omrørt ved romtemp. (20 °C) i 1 time. 1-(6-brom-pyridin-2-yl)-3-karboetoksy-tiourinstoff (**2**) (89,0 g, 0,293 mol) kan deretter tilsettes og blandingen blir langsomt oppvarmet til tilbakeløp (Bemerk: blekeskrubber er nødvendig for å quenche utviklet H₂S). Etter 3 timer ved tilbakeløp, får blandingen avkjøle og filtreres for å oppsamle det utfelte faste stoff. Ytterligere produkt kan oppsamles ved inndampning i *vakuum* av filtratet, tilsetning av H₂O (250 ml) og filtrering. De samlede faste stoffer blir vasket suksessivt med H₂O (250 ml), EtOH/MeOH (1:1, 250 ml) og Et₂O (250 ml) deretter tørket i *vakuum*, hvilket gir triazolpyridinderivatet (**3**) som et fast stoff. Forbindelsen kan anvendes som sådan for neste trinn uten noen rensning. ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,43-7,34 (2H, m, 2 × aromatisk-H), 7,24 (1H, dd, *J* 6,8 og 1,8 Hz, aromatisk-H), 6,30 (2H, br, NH₂); *m/z* 213/215 (1:1, M+H⁺, 100%).

1.1.3 Generell prosedyre for mono-acylering for å gi mellomprodukt (4):

20



25

Til en løsning av 2-amino-triazolpyridin (**3**) (7,10 g, 33,3 mmol) i tørr CH₃CN (150 ml) ved 5 °C blir det tilsatt Et₃N (11,6 ml, 83,3 mmol) fulgt av det passende syreklorid (83,3 mmol). Reaksjonsblandingens blir deretter oppvarmet til omgivelsestemperatur og omrørt inntil alt utgangsmateriale (**3**) er oppbrukt. Hvis nødvendig, kan ytterligere Et₃N (4,64 ml, 33,3 mmol) og syrekloridet (33,3 mmol) tilsettes for å sikre fullstendig

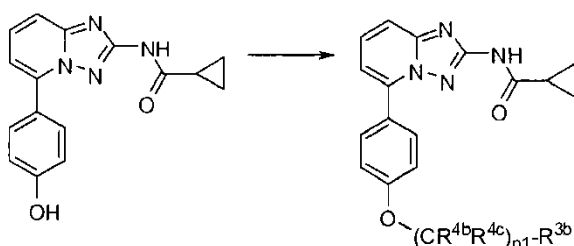
reaksjon. Etter løsningsmiddelindampning *i vakuum*, blir det resulterende residuet behandlet med 7 N metanolisk ammoniakkløsning (50 ml) og omrørt ved omgivelsestemp. (i 1-16 t) for å hydrolysere hvilket som helst bis-acylert produkt. Produktisolering gjennomføres ved fjerning av flyktige stoffer *i vakuum* fulgt av utgning med Et₂O (50 ml). De faste stoffene kan oppsamles ved filtrering, vaskes med H₂O (2×50 ml), aceton (50 ml) og Et₂O (50 ml), tørkes deretter *i vakuum*, hvilket gir det nødvendige acyl-mellomprodukt **(4)**. I noen tilfeller kan kolonnekromatografi (petrol/EtOAc) være nødvendig for å oppnå rene forbindelser.

Metode A

1.1.4 Fremstilling av forbindelser med formel I via Suzuki kopling (5):

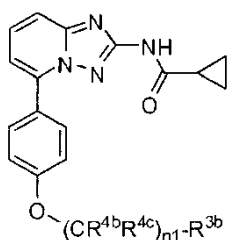
En passende borsyre (2ekv.) blir satt til en løsning av brom mellomprodukt **(4)** i 1,4-dioksan/vann (5:1). K₂CO₃ (2 ekv.) og PdCl₂dppf (5%) blir satt til løsningen. Den resulterende blandingen blir deretter oppvarmet i en mikrobølgeovn ved 140 °C i 30 min (Denne reaksjonen kan også utføres ved tradisjonell oppvarmning i et oljebad ved 90 °C i 16 timer under N₂). Vann blir tilsatt og løsningen blir ekstrahert med etylacetat. De organiske lag blir tørket over MgSO₄ og inndampet *i vakuum*. Den endelige forbindelse blir oppnådd etter rensning ved flashkromatografi.

Metode C



hvor R^{4a}, R^{4b}, R^{4c}, R^{3b} og n1 er som beskrevet her.

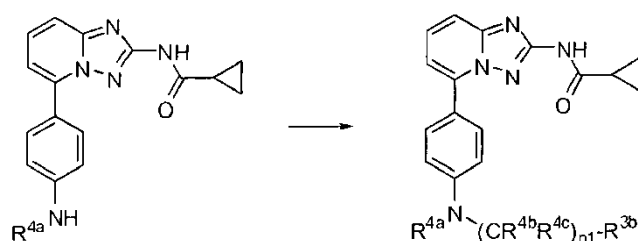
Alkyleringsreaksjon (Generell metode)



- 5 Cyklopropankarboksylsyre [5-(4-hydroksy-fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl]-amid (1,1 ekv) oppnådd ved Metode A og K_2CO_3 (5 ekv) (eller $AgCO_3$) oppløses i DMF under N_2 og det passende alkyleringsmiddel (1,1 ekv) blir tilsatt dråpevis. Den resulterende suspensjonen blir oppvarmet ved 50 °C i 16 timer. Etter denne tid, er reaksjonen fullstendig. Forbindelsen blir ekstrahert med EtOAc og vann, vasket med
- 10 saltvann og tørket over $MgSO_4$. Organiske lag blir filtrert og inndampet. Den endelige forbindelse blir isolert ved preparativ HPLC. Preparative HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μ m ODB 19mm ID x 100mm L (Del nr. 186002978). Alle metodene er ved anvendelse av MeCN/ H_2O gradienter. H_2O inneholder enten 0,1% TFA eller 0,1 % NH_3 .

Metode E

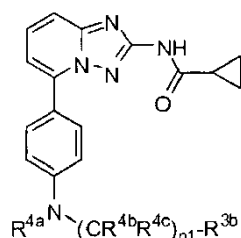
15



hvor R^{4a} , R^{4b} , R^{4c} , R^{3b} og $n1$ er som beskrevet her.

Reduktiv aminering (Generell metode)

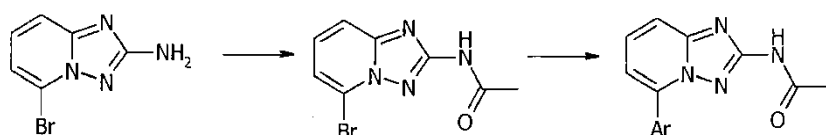
20



- 5 Det passende aldehyd (2 ekv.), anilinderivatet (1 ekv.) oppnådd ved Metode A og Ti(OPr)_4 blir blandet og omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Blandingen blir fortynnet i etanol og Na(CN)BH_3 (1ekv.) blir tilsatt. Den resulterende løsningen blir omrørt ved romtemperatur i 16 timer. Blandingen blir fortynnet i vann og filtrert. Filtratet blir vasket med etanol. De samlede løsningsmiddelfaser blir inndampet under vakuum.
- 10 Den endelige forbindelse blir isolert ved preparativ HPLC.

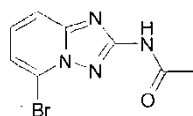
Preparativ HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19mm ID x 100mm L (Del nr. 186002978). Alle metodene er ved anvendelse av MeCN/ H_2O gradienter. H_2O inneholder enten 0,1% TFA eller 0,1 % NH_3 .

15 Metode F



hvor Ar er $\text{Cy1-L1-(CR}^{4b}\text{R}^{4c})_{n1}\text{-R}^{3b}$; og Cy1, L1, n1, R^{3b} , R^{4b} og R^{4c} er som beskrevet her.

20 N-(5-brom-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)-acetamid



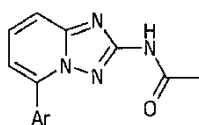
- 25 Til en løsning av 5-brom-2-amino-tiazolopyridinet (1 ekv.) i tørr CH_3CN blir det ved 5

°C tilsatt Et_3N (2,5 ekv.) fulgt av acetylklorid (2,5 ekv.). Reaksjonsblandingen blir deretter oppvarmet til omgivelsestemperatur og omrørt inntil alt utgangsmateriale er oppbrukt. Hvis nødvendig blir ytterligere Et_3N (1 ekv.) og syreklorid (1 ekv.) tilsatt for å sikre fullstendig reaksjon. Etter løsningsmiddelavdamping *i vakuum* blir det

5 resulterende residuet behandlet med 7 N metanolisk ammoniakkløsning og omrørt ved omgivelses- temp. (i 16 t) for å hydrolyse eventuelt bis-acylert produkt. Produktisolering er gjort ved fjerning av flyktige forbindelser *i vakuum* fulgt av tilsetning av vann og ekstraksjon med etylacetat. Den organiske fasen blir deretter tørket over MgSO_4 , inndampet *i vakuum*. Forbindelsen blir anvendt uten ytterligere

10 rensning.

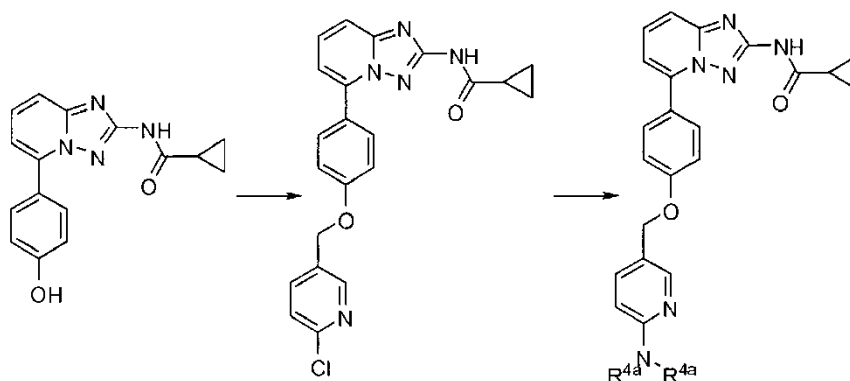
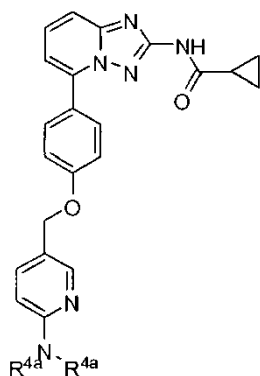
Suzuki reaksjon (Generell metode)



15 Borsyrer (2ekv.) blir satt til en løsning av N-(5-brom-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)-acetamid i 1,4-dioksan/vann (5:1). K_2CO_3 (2 ekv.) og $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (5%) (dppf = 1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen) blir satt til løsningen. Den resulterende blandingen blir deretter oppvarmet i en mikrobølgeovn (CEM "discover") i et forseglet rør ved 140 °C i

20 30 min. Vann blir tilsatt og løsningen blir ekstrahert med etylacetat. De organiske lag blir tørket over MgSO_4 og inndampet *i vakuum*. Den endelige forbindelse blir oppnådd etter rensning ved preparativ HPLC. Analytisk: Waters Acqity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1mm ID x 50mm L (Del nr. 186002350).

25 Preparativ HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19mm ID x 100mm L (Del nr.186002978). Alle metodene er ved anvendelse av MeCN/ H_2O gradienter. H_2O inneholder enten 0,1% TFA eller 0,1% NH_3 .

Metode L**L.1 Nukleofil aromatisk substitusjon (Generell metode)**

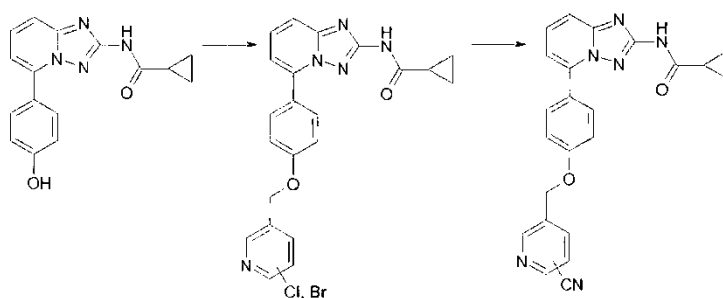
5

Cyklopropankarboksylsyre {5-[4-(6-klor-pyridin-3-ylmetoksy)-fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid fremstilt ved metode C (1 ekv), et passende amin, (1,5 ekv.) blir blandet i *DMSO* i et forseglet rør. Reaksjonsblandingen blir oppvarmet ved 100 °C i 24 timer. Når all SM har forsvunnet ved LCMS, blir vann satt til reaksjonsblandingen og de organiske faser blir ekstrahert med etylacetat. Det organiske laget blir tørket over MgSO_4 og avdampet under vakuum. Den endelige forbindelse blir isolert ved preparativ HPLC. Analytisk: Waters Ackity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1mm ID x 50mm L (Del nr.186002350)

15

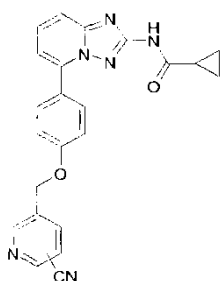
Preparativ HPLC: Waters XBridge Prep C18 5 μm ODB 19mm ID x 100mm L (Del nr.186002978). Alle metodene er ved anvendelse av MeCN/H₂O gradienter. H₂O inneholder enten 0,1% TFA eller 0,1 % NH₃.

Metode N



N.1 Cyklopropankarboksylsyre {5-[4-(nitril-arylmetoksy)fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid

5



10

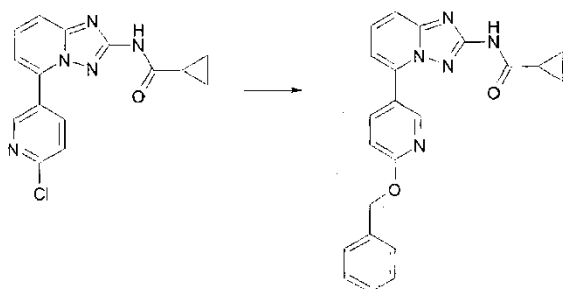
Pd(PPh₃)₄ (0,04 mmol) blir satt til avgasset løsning av cyklopropankarboksylsyre {5-[4-(halogenaryl-3-ylmetoksy)-fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid fremstilt ved metode B (0,24 mmol) og Zn(CN)₂ (0,24 mmol) i DMF (1 ml).

Reaksjonsblandingen blir eksponert for mikrobølgestråling (W:150 W; T: 150°C) i 30 min. Blandingen blir fortynnet med etylacetat og vasket med vann. Det organiske laget blir tørket over MgSO₄, filtrert og løsningsmidlet blir fjernet under vakuum. Forbindelsen blir renset ved preparativ HPLC, hvilket gir produktet (30 % til 50 %).

15

Syntese av representative forbindelser med formel I og forbindelsen med formel VIa

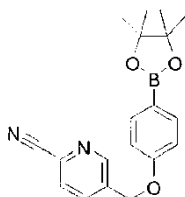
Sammenligningsforbindelse 57: Cyklopropankarboksylsyre[5-(6-benzylloksypyridin-3-yl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl]-amid



5 Ved 0°C og under N₂ atmosfære, ble benzylalkohol (2 ekv.) i en løsning av THF
behandlet med NaH 60 % i mineralolje (4 ekv.) i 30 min. Deretter ble
cyklopropankarboksylysyre [5-(6-klor-pyridin-3-yl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl]-
amid fremstilt ved metode A satt til løsningen og blandingen ble omrørt ved 70°C i 3
timer. Reaksjonen ble fullført. Reaksjonsblandingen ble behandlet med vann og
forbindelsen ble ekstrahert med EtOAc. Forbindelsen ble vasket med saltvann, tørket
10 på MgSO₄, filtrert og konsentrert. Forbindelse ble renset på preparativ HPLC.

Forbindelse 176: *N*-(5-(4-((6-cyanopyridin-3-yl)metoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid

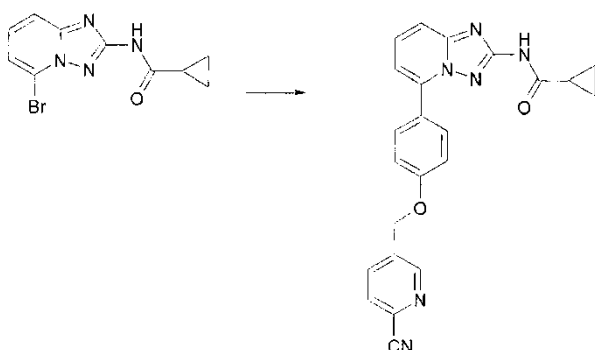
15 **176.1: Syntese av 5-[4-(4,4,5,5-Tetrametyl-[1,3,2]dioksaborolan-2-yl)-fenoksymetyl]-pyridin-2-karbonitril**



20 Til 4-hydroksyfenylborsyre pinacolester (25 g; 0,11 mol; 1,0 ekv.) i aceton (250 ml)
blet et ved romtemperatur tilsatt under argon 5-klormetyl-pyridin-2-karbonitril (19 g;
0,12 mol; 1,1 ekv.) og cesiumkarbonat (73,9 g, 0,22 mol; 2 ekv.).
Reaksjonsblandingen ble oppvarmet i 4 timer ved tilbakeløp. Blandingen ble deretter
avkjølt til romtemperatur, acetonet ble inndampet. Vann (200 ml) ble tilsatt og

produktet ble ekstrahert med EtOAc (3 x 200 ml). Det organiske laget ble tørket over magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert til tørrhet. Det resulterende residuet ble rensert ved kromatografi over silikagel (petrol: EtOAc 10:1), hvilket gir det forventede borat som et hvitt, fast stoff.

5 **176.2: Syntese of cyclopropankarboksylsyre {5-[4-(6-cyano-pyridin-3-ylmetoksy)-fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid**



10

5-[4-(4,4,5,5-tetrametyl-[1,3,2]dioksaborolan-2-yl)-fenoksymetyl]-pyridin-2-karbonitril (10 g, 0,03 mol, 1,1 ekv.) ble satt til en løsning av

cyklopropankarboksylsyre (5-brom-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)-amid (7,6 g, 0,027 mol) i 1,4-dioksan/vann (4:1; 70 ml). K₂CO₃ (7,45, 0,054 mol, 2 ekv.) og

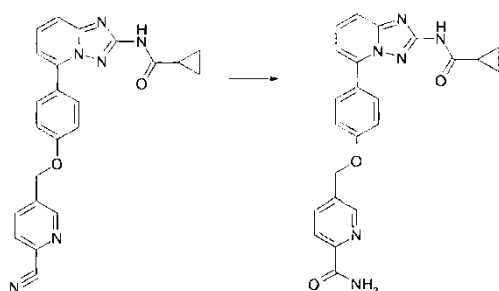
15

PdCl₂dppf (5%) ble satt til løsningen. Den resulterende blandingen ble deretter oppvarmet i et oljebad ved 90 °C under N₂ inntil reaksjonen var ferdig (overvåket ved LCMS). 1,4-dioksan ble fjernet under vakuum og vann/EtOAc ble tilsatt og det faste stoffet ble filtrert. Det oppnådde faste stoff ble oppløst i metanol/DCM, tørket over

MgSO₄ og den endelige forbindelse ble oppnådd etter rensing ved flashkromatografi, eluert med ren EtOAc som et hvitt, fast stoff.

20

Sammenligningsforbindelse 192: 5-{4-[2-(cyclopropankarbonyl-amino)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-5-yl]-fenoksymetyl}-pyridin-2-karboksylsyreamid

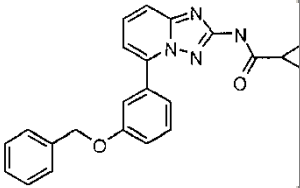
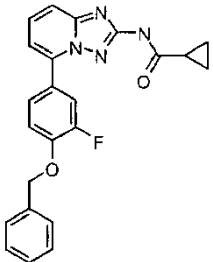
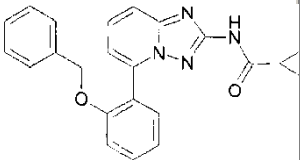
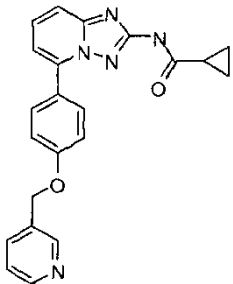
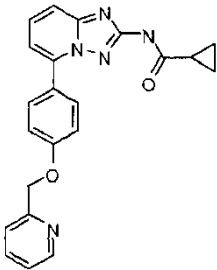


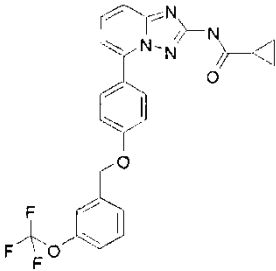
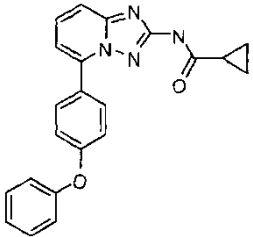
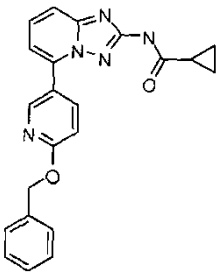
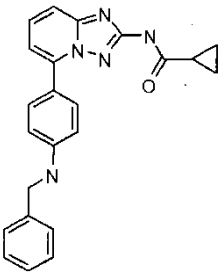
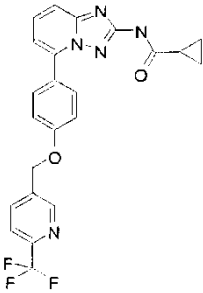
Til en løsning av cyklopropankarboksylsyre {5-[4-(6-cyano-pyridin-3-ylmetoksy)-
 5 fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid (30 mg, 0,073 mmol, 1 ekv.) og K₂CO₃
 (10 mg, 0,073 mmol, 1 ekv.) i DMSO (0,2 ml) ved 10°C, ble 30% H₂O₂ (17 µL, 0,146
 mmol, 2 ekv.) tilsatt dråpevis. Etter omrøring ved romtemperatur av blandingen i 4
 timer, ble den fortynnet med DMSO og filtrert. Filtratet ble underkastet preparativ
 HPLC rensing: UPLC system (XBridge™ Prep C18, 5 µm, 19x100 mm kolonne); 8 min
 10 LC; strømning: 20 ml/min; gradient: fra 30% til 70% acetonitril i vann 0,1 % TFA;
 isolering av det endelige rene produkt.

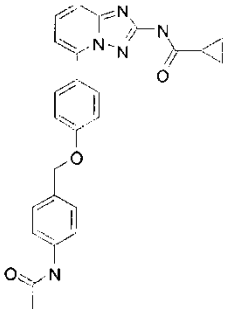
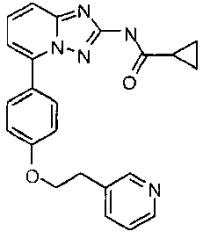
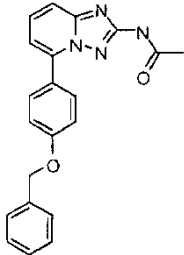
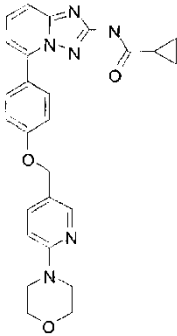
Eksempler på sammenligningsforbindelser og forbindelsen med formel VIa
 (Forbindelse 176) som er eller kan fremstilles i henhold til syntese-metodene
 15 beskrevet her er listet opp i Tabell I nedenfor. Data for NMR spektra for noen
 representative sammenlignings- forbindelser og forbindelsen med formel VIa
 (Forbindelse 176) er gitt i Tabell II.

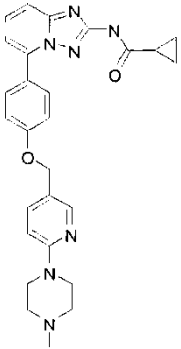
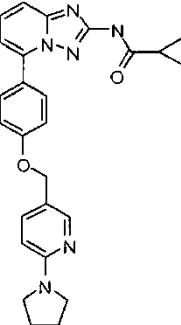
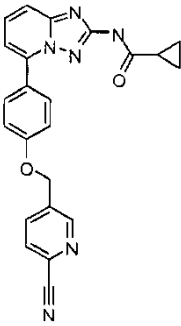
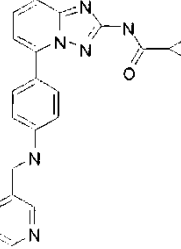
Tabell I

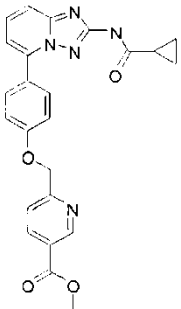
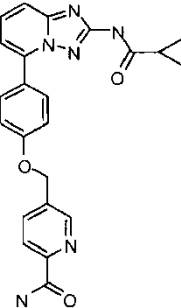
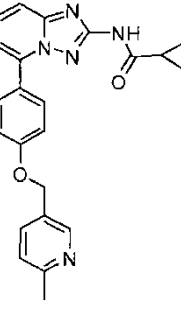
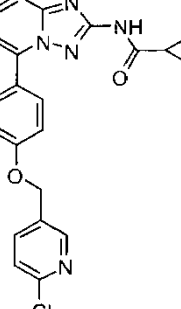
Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
12		N-(5-(4-(benzyloksy)fenyl)- 1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2- yl)cyklopropan-karboksamid	A	384,44	385,10
14		N-(5-(3-(benzyloksy)fenyl)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2- yl)cyklopropan-karboksamid	A	384,44	385,20

Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
					
15		N-(5-(4-(benzyloksy)-3-fluorfenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	A	402,43	403,10
16		N-(5-(2-(benzyloksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	A	384,44	385,20
36		N-(5-(4-(pyridin-3-ylmetoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	C	385,43	408,0 (M ⁺ +Na)
37		N-(5-(4-(pyridin-2-ylmetoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	C	385,43	408,0 (M ⁺ +Na)
38		N-(5-(4-(3-(trifluorometoksy)benzyloksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	c	468,44	469,00

Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
					
46		N-(5-(4-fenoksyfenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	A	370,41	371,00
57		N-(5-(6-(benzyloksy)pyridin-3-yl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	Beskrevet ovenfor	385,43	386,00
72		N-(5-(4-(benzylamino)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	E	383,46	384,00
78		N-(5-(4-((6-(trifluormetyl)pyridin-3-yl)metoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	C	453,43	454,00
92		N-(5-(4-(4-	C	441,49	442,00

Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
		acetamidobenzylloksy)fenyl) - [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid			
127		N-(5-(4-(2-(pyridin-3-yl)etoksy)fenyl)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	C	399,45	400,0
163		N-(5-(4-(benzyloksy)fenyl)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)acetamid	F	358,40	359,0
165		N-(5-(4-((6-morfolinopyridin-3-yl)metoksy)fenyl)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	L	470,53	471,1
167		N-(5-(4-((6-(4-metylpiperazin-1-yl)pyridin-3-yl)metoksy)fenyl)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyklopropankarboksamid	L	483,58	484,1

Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
					
174		N-(5-(4-((6-(pyrrolidin-1-yl)pyridin-3-yl)metoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyclopropankarboksamid	L	454,53	455,1
176		N-(5-(4-((6-cyanopyridin-3-yl)metoksy)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyclopropankarboksamid	Metode beskrevet ovenfor	410,44	411,0
182		N-(5-(4-(pyridin-3-ylmethylamino)fenyl)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl)cyclopropankarboksamid	E	384,44	385,0
190		metyl 6-((4-(2-(cyclopropankarboksamido)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-5-yl)fenyl)cyclopropan-	C	443,47	444,0

Forb. nr	Struktur	Navn	Metode	MW	MS Mes'd
		karboksamido)- [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-5-yl)fenoksy)metyl)nikotinat			
192		5-((4-(2-(cyklopropankarboksamido)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-5-yl)fenylcyklopropankarboksamido)-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-5-yl)fenoksy)metyl)pikolinamid	Beskrevet ovenfor	428,45	429,1
197		Cyklopropankarboksylsyre-{5-[4-(6-metyl-pyridin-3-ylmetoksy)-fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid	C	399,45	400,1
198		Cyklopropankarboksylsyre-{5-[4-(6-klor-pyridin-3-ylmetoksy)-fenyl]-[1,2,4]triazol[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid	C	419,87	420,0

Tabell II: NMR Data for representative sammenligningsforbindelser og forbindelsen med formel VIa

Forb. nr	(δ) NMR data
12	(^1H , CDCl_3) 8,70 (1H, b, NH), 7,97 (2H, d, ArH), 7,60-7,30 (7H, m, ArH), 7,15 (2H, m, ArH), 7,07 (1H, m, ArH), 5,17 (2H, s, CH_2), 1,60 (1H, under vann topp, CH), 1,21 (2H, m, CH_2), 0,94 (2H, m, CH_2)
15	(^1H , DMSO) 11,04 (1H, br, NH), 8,08 (1H, d, ArH), 7,88 (1H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,51 (2H, d, ArH), 2,48-7,30 (5H, m, ArH), 5,32 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
36	(^1H , DMSO) 11,03 (1H, br, NH), 8,62 (1H, m, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,89 (1H, m, ArH), 7,66 (2H, m, ArH), 7,58 (1H, d, ArH), 7,40 (1H, dd, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,21 (2H, d, ArH), 5,31 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
37	(^1H , DMSO) 11,01 (1H, br, NH), 8,04 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,55 (2H, m, ArH), 7,50 (1H, s, ArH), 7,38 (1H, d, ArH), 7,28 (1H, d, ArH), 7,20 (2H, d, ArH), 5,30 (2H, s, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
38	(^1H , DMSO) 11,01 (1H, br, NH), 8,00 (2H, d, ArH), 7,69 (2H, d, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,64 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,11 (2H, d, ArH), 4,07 (2H, d, CH_2), 2,78 (1H, m, CH), 2,2-1,8 (7H, m, CH, $3\times\text{CH}_2$), 0,83 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
57	(^1H , DMSO) 11,18 (1H, br, NH), 8,01 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,09 (2H, d, ArH), 4,12 (2H, t, CH_2), 2,86 (2H, t, CH_2), 2,28 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$).
72	(^1H , DMSO) 10,95 (1H, br, NH), 7,85 (2H, d, ArH), 7,61 (1H, dd, ArH), 7,51 (1H, d, ArH), 7,40 (4H, m, ArH), 7,36 (1H, m, ArH), 7,24 (1H, d, ArH), 7,09 (4H, m, ArH), 6,88 (1H, m, ArH), 6,70 (2H, d, ArH), 4,37 (2H, d, CH_2), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
73	(^1H , DMSO) 11,05 (1H, s, NH), 8,09 (2H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,3-7,56 (7H, m, ArH), 7,36 (1H, m, ArH), 4,54 (1H, b, CH), 3,80 (2H, m, CH_2), 3,06 (1H, br, CH), 2,02-1,80 (4H, br, $2\times\text{CH}$, CH_2), 1,58 (2H, m, CH_2), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
78	(^1H , DMSO) 11,05 (1H, s, NH), 8,09 (2H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,3-7,56 (7H, m, ArH), 7,36 (1H, m, ArH), 4,54 (1H, b, CH), 3,80 (2H, m, CH_2), 3,06 (1H, br, CH), 2,02-1,80 (4H, br, $2\times\text{CH}$, CH_2), 1,58 (2H, m, CH_2), 0,81 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$)
92	(^1H , DMSO) 11,03 (1H, br, NH), 10,01 (1H, br, NH), 8,00 (2H, d, ArH), 7,65 (4H, m, ArH), 7,41 (2H, d, ArH), 7,27 (1H, m, ArH), 7,17 (2H, d, ArH), 5,15 (2H, s, CH_2), 2,04 (4H, m, CH_3 , CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$).
127	(^1H , DMSO), 10,98 (1H, s, NH), 8,63 (1H, s, ArH), 8,51 (1H, m, ArH), 8,00 (2 timer, d, ArH), 7,91 (1H, d, ArH), 7,64 (2H, m, ArH), 7,46 (1H, m, ArH), 7,24 (1H, m, ArH), 7,13 (2H, m, ArH), 4,36 (2H, t, CH_2), 3,14 (2H, t, CH_2), 2,04 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, $2\times\text{CH}_2$).

Forb. nr	(δ) NMR data
163	(^1H , DMSO) 10,72 (1H, br, NH), 7,99 (2H, m, ArH), 7,65 (2H, b, ArH), 7,48 (4H, b, ArH), 7,18 (2H, m, ArH), 5,21 (2H, d, CH ₂), 2,12 (3H, br, CH ₃)
165	(^1H , DMSO) 8,26 (1H, d, ArH), 8,01 (2H, d, ArH), 7,68 (2H, m, ArH), 7,62 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, d, ArH), 7,17 (2H, d, ArH), 6,87 (1H, d, ArH), 5,10 (2H, s, CH ₂), 3,69 (4H, t, 2xCH ₂), 3,46 (4H, t, 2xCH ₂), 2,07 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂)
167	(^1H , DMSO) 11,00 (1H, br, NH), 10,03 (1H, br, NH), 8,31 (1H, d, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,76 (1H, d, ArH), 7,69 (1H, m, ArH), 7,63 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, m, ArH), 7,18 (2H, m, ArH), 7,00 (1H, d, ArH), 5,12 (2H, s, CH ₂), 4,41 (2H, br, CH ₂), 3,49 (2H, br, CH ₂), 3,15 (4H, br, 2xCH ₂), 2,84 (3H, s, CH ₃), 2,04 (1H, br, CH), 0,82 (4H, m, 2xCH ₂)
174	(^1H , DMSO) 11,02 (1H, br, NH), 8,14 (1H, s, ArH), 8,03 (3H, m, ArH), 7,66 (2H, m, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,20 (2H, dd, ArH), 7,10 (1H, d, ArH), 5,17 (2H, s, CH ₂), 3,53 (4H, t, 2xCH ₂), 2,02 (5H, t, 2xCH ₂ ,CH), 0,82 (4H, m, 2xCH ₂).
176	(^1H , DMSO) 11,0 (1H, br, NH), 8,89 (1H, s, ArH), 8,16 (1H, d, ArH), 8,09 (1H, d, ArH), 8,04 (2H, d, ArH), 7,67 (2H, m, ArH), 7,27 (1H, d, ArH), 7,23 (2H, d, ArH), 5,41 (2H, s, CH ₂), 2,04 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂).
182	(^1H , DMSO) 10,94 (1H, b, NH), 8,62 (1H, s, ArH), 8,46 (1H, d, ArH), 7,86 (2H, d, ArH), 7,78 (1H, d, ArH), 7,62 (1H, dd, ArH), 7,51 (1H, d, ArH), 7,37 (1H, m, ArH), 6,89 (1H, m, NH), 6,73 (2H, d, ArH), 6,57 (1H, s, ArH), 4,42 (2H, d, CH ₂), 2,05 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂).
190	(^1H , DMSO) 11,04 (1H, br, NH), 9,11 (1H, s, ArH), 8,38 (1H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,69 (3H, m, ArH), 7,22 (3H, m, ArH), 5,41 (2H, s, ArH), 3,90 (3H, s, ArH), 2,04 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂).
192	(^1H , DMSO) 11,07 (1H, b, NH), 8,76 (1H, s, ArH), 8,16 (1H, br, ArH), 8,09 (2H, s, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,68 (3H, m, ArH), 7,28 (1H, d, ArH), 7,23 (2H, d, ArH), 5,38 (2H, s, CH ₂), 2,02 (1H, br, CH), 0,81 (4H, m, 2xCH ₂).
197	(^1H , DMSO) 10,99 (1H, b, NH), 8,57 (1H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 7,79 (1H, dd, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,63 (1H, dd, ArH), 7,29 (1H, d, ArH), 7,26 (1H, dd, ArH), 7,20 (2H, d, ArH), 5,22 (2H, s, CH ₂), 2,50 (3H, s, CH ₃), 2,03 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂).
198	(^1H , DMSO) 10,99 (1H, b, NH), 8,56 (1H, m, ArH), 8,03 (2H, d, ArH), 7,99 (1H, dd, ArH), 7,69 (1H, dd, ArH), 7,63 (1H, dd, ArH), 7,58 (1H, d, ArH), 7,27 (1H, dd, ArH), 7,21 (2H, d, ArH), 5,29 (2H, s, CH ₂), 2,04 (1H, b, CH), 0,81 (4H, m, CH ₂).

Biologiske eksempler

Eksempel 1 – in vitro analyser

Eksempel 1.1 JAK1 inhiberingsanalyse

Rekombinant humant JAK1 katalytisk domene (aminosyrer 850-1154; katalog nr. 08-144) ble innkjøpt fra Carna Biosciences. 10 ng JAK1 ble inkubert med 12,5 µg polyGT-substrat (Sigma, katalog nr. P0275) i kinasereaksjonsbuffer (15 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,01 % Tween-20, 10 mM MgCl₂, 2 µM ikke-radioaktiv ATP, 0,25 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, katalog nr. AH9968) sluttkonsentrasjoner) med og uten 5 µL inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalt volum av 25 µL, i en polypropylen 96-brønns plate (Greiner, V-bunn). Etter 45 minutter ved 30°C, ble reaksjoner stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. All terminert kinasereaksjon ble overført til forvasket (75 mM fosforsyre) 96 brønns filterplater (Perkin Elmer, katalog nr. 6005177) ved anvendelse av en cellehøster (Perkin Elmer). Plater ble vasket 6 ganger med 300 µL pr. brønn av en 75 mM fosforsyreoppløsning, og bunnen av platene ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platen ble forseglet, og utlesing ble gjennomført ved anvendelse av Topcount (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere tellinger pr. minutt (cpm) oppnådd i nærvær av en positiv kontrollinhibitor (10 µM staurosporin) fra cpm oppnådd i nærvær av vehikkel. En testforbindelsesevne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

20

Prosentandel inhibering = ((cpm bestemt for prøve med testforbindelse tilstede – cpm bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor) delt med (cpm bestemt i nærvær av vehikkel – cpm bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor))*100 %.

Dosefortynningsserier ble fremstilt for forbindelsene som muliggjør testing av doseresponseeffekter JAK1-analysen, og beregningen av IC₅₀ for hver forbindelse. Hver forbindelse ble rutinemessig testet ved en konsentrasjon på 20 µM, etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, 8 punkter (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) i en sluttkonsentrasjon av 1 % DMSO. Når styrken av forbindelsesserier økte, ble flere fortynninger fremstilt, og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5 µM, 1 µM).

30

Semikvantitativ skår:

* > 501 nM

35

** 101-500 nM

*** 0,1-100 nM

Tabell III: JAK1 IC₅₀-verdier for forbindelser

Forb. nr.	JAK1
12	***
14	**
15	***
36	***
37	***
38	**
57	***
72	***
78	***
92	***
127	**

G100833

G106233

Forb. nr.	JAK1
163	***
165	**
167	**
174	*
176	***
182	***
190	***
192	***
197	***
198	***

Eksempel 1.2 JAK2 inhiberingsanalyse

- 5 Rekombinant humant JAK2 katalytisk domene (aminosyrer 808-1132; katalog nr. PV4210) ble innkjøpt fra Invitrogen. 0,025 mU JAK2 ble inkubert med 2,5 µg polyGT-substrat (Sigma katalog nr. P0275) i kinasereaksjonsbuffer (5 mM MOPS pH 7,5, 9 mM MgAc, 0,3 mM EDTA, 0,06 % Brij og 0,6 mM DTT, 1 µM ikke-radioaktiv ATP, 0,25 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, katalog nr. AH9968) sluttkonsentrasjoner), med
- 10 eller uten 5 µL inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalt volum av 25 µL, i en polypropylen 96-brønns plate (Greiner, V-bunn). Etter 90 min. ved 30°C, ble reaksjoner stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. All den terminerte kinasereaksjon ble overført til forvaskede (75 mM fosforsyre) 96-brønns filterplater (Perkin Elmer, katalog nr.
- 15 6005177) ved å anvende en cellehøster (Perkin Elmer). Plater ble vasket 6 ganger med 300 µL pr. brønn av en 75 mM fosforsyreoppløsning, og bunnen av platen ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platen ble forseglet, og utlesing ble gjennomført ved å anvende Topcount (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere tellinger pr. minutt (cpm) oppnådd i nærvær av en positiv
- 20 kontrollinhibitor (10 µM staurosporin) fra cpm oppnådd i nærvær av vehikkel. En testforbindelses evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

Prosentandel inhiberinger = ((cpm bestemt for prøve med testforbindelse tilstede – cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor) / (cpm bestemt i nærvær av vehikkel – cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor)) * 100 %.

Dose-fortynnesserier ble fremstilt for forbindelsene som muliggjør testing av dose-respons effekter i JAK2-analysen, og beregningen av IC_{50} for hver forbindelse. Hver forbindelse ble rutinemessig testet ved en konsentrasjon på 20 μ M etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, 8 punkter (20 μ M – 6,67 μ M – 2,22 μ M – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) i en sluttkonsentrasjon av 1 % DMSO. Når styrken av forbindelses-serier økte, ble flere fortynninger fremstilt, og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5 μ M, 1 μ M).

Semikvantitativ skår:

> 501 nM

101-500 nM

1-100 nM

Tabell IV: JAK2 IC_{50} -verdier av forbindelser

Forbindelse nr.	JAK2
12	###
14	#
36	###
37	###
57	###
72	###
78	###
92	##
163	####
176	###
197	###
198	###

Eksempel 1.3 JAK3 inhiberingsanalyse

Rekombinant humant JAK3 katalytisk domene (aminosyrer 781-1124; katalog nr. PV3855) ble innkjøpt fra Invitrogen. 0,025 mU av JAK3 ble inkubert med 2,5 μ g polyGT-substrat (Sigma katalog nr. P0275), i kinasereaksjonsbuffer (25 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM Na_3VO_4 , 5 mM b-glyserolfosfat, 0,01 % Triton X-100, 1 μ M ikke-radioaktiv ATP, 0,25 μ Ci 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, katalog nr. AH9968, sluttkonsentrasjoner) med eller uten 5 μ L inneholdende testforbindelse eller vehikkel

(DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon) i et totalt volum på 25 µL i en polypropylen 96-brønns plate (Greiner, V-bunn). Etter 105 min. ved 30°C, ble reaksjonene stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. All terminert kinasereaksjon ble overført til forvaskede (75 mM fosforsyre) 96-brønns filterplater (Perkin Elmer katalog nr. 6005177) ved anvendelse av en cellehøster (Perkin Elmer). Plater ble vasket 6 ganger med 300 µL pr. brønn av en 75 mM fosforsyreoppløsning og bunnen av platen ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platen ble forseglet, og utlesing ble gjennomført ved å anvende Topcount (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere tellinger pr. minutt (cpm) oppnådd i nærvær av en positiv kontrollinhibitor (10 µM staurosporin) fra cpm oppnådd i nærvær av vehikkel. Testforbindelsens evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

Prosentandel inhibering = $\left(\frac{\text{cpm bestemt for prøve med testforbindelse tiltsede} - \text{cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor}}{\text{cpm bestemt i nærvær av vehikkel} - \text{cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor}} \right) * 100 \%$.

Dosefortynningsserier ble fremstilt for forbindelsene som muliggjør testing av dose respons effektene i JAK3-analysen, og beregningen av IC₅₀ for hver forbindelse. Hver forbindelse ble rutinemessig testet ved en konsentrasjon på 20 µM etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, 8 punkter (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) i en sluttkonsentrasjon på 1 % DMSO. Når styrken av forbindelsesserier økte ble flere fortynninger fremstilt og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5 µM, 1 µM).

Semikvantitativ skår:

JAK3

+ > 501 nM

++ 101-500 nM

+++ 1-100 nM

Tabell V: JAK3 IC₅₀-verdier for forbindelser

Forbindelse nr.	JAK3
12	+++
15	++
36	++
37	+
57	+

72	+
78	++
163	++
176	+++

Eksempel 1.4 TYK2 inhiberingsanalyse

Rekombinant humant TYK2 katalytisk domene (aminosyrer 871-1187; katalog nr. 08-147) ble innkjøpt fra Carna biosciences. 5 ng TYK2 ble inkubert med 12,5 µg polyGT-substrat (Sigma katalog nr. P0275) i kinasereaksjonsbuffer (25 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2 mM Na₃VO₄, 0,1 % NP-40, 0,1 µM ikke-radioaktiv ATP, 0,125 µCi 33P-gamma-ATP (GE Healthcare, katalog nr. AH9968) sluttkonsentrasjoner) med eller uten 5 µL inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalt volum på 25 µL, i en polypropylen 96-brønns plate (Greiner, V-bunn). Etter 90 min. ved 30°C, ble reaksjoner stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. All terminert kinasereaksjon ble overført til forvaskede (75 mM fosforsyre) 96-brønns filterplater (Perkin Elmer katalog nr. 6005177) ved anvendelse av en cellehøster (Perkin Elmer). Plater ble vasket 6 ganger med 300 µL pr. brønn av en 75 mM fosforsyreoppløsning, og bunnen til platen ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platene ble forseglet, og utlesing ble gjennomført ved å anvende Topcount (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere tellinger pr. minutt (cpm) oppnådd i nærvær av en positiv kontroll inhibitor (10 µM staurosporin) fra cpm oppnådd i nærvær av vehikkel. En testforbindelses evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

20

Prosentandel inhibering = ((cpm bestemt for prøve med testforbindelse tilstede - cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor) dividert med (cpm bestemt i nærvær av vehikkel - cpm bestemt for prøve med positiv kontroll inhibitor))*100 %.

25

Dosefortynningsserier ble fremstilt for forbindelsene som muliggjør testing av dose respons effekter ved TYK2-analysen, og beregning av IC₅₀ for hver forbindelse. Hver forbindelse ble rutinemessig testet ved en konsentrasjon på 20 µM, etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, og 8 punkter (20 µM – 6,67 µM – 2,22 µM – 740 nM – 247 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) i en sluttkonsentrasjon på 1 % i DMSO. Når styrken av forbindelsesserier økte, ble flere fortynninger fremstilt og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5 µM, 1 µM).

30

Semikvantitativt skår:

* > 1001 nM

** 501-1000 nM

*** 101-500 nM

**** 1-100 nM

5

Tabell VI: TYK2 IC₅₀-verdier av forbindelser

Forbindelse nr.	TYK2
15	*
36	****
37	**
57	*
72	*
92	*
163	*
176	****

10 Eksempel 2. Celleanalyser

JAK2.1 JAK-STAT signalleringsanalyse:

HeLa-celler ble holdt i Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) inneholdende 10 % varmeinaktivert føtalt kalveserum, 100 U/ml penicillin og 100 µg/mL streptomycin.

15 HeLa-celler ble anvendt ved 70 % konfluens for transfeksjon. 20000 celler i 87 µL cellekulturmedium ble transient tranfektert med 40 ng pSTAT1(2)-luciferasereporter (Panomics), 8 ng LacZ-reporter som intern kontrollreporter og 52 ng pBSK ved anvendelse av 0,32 µL Jet-PEI (Polyplus) som transfeksjonsreagens pr. brønn i 96-brønns plateformat. Etter inkubasjon over natten ved 37°C, ble 10 % CO₂ transfeksjonsmedium fjernet. 75 µL DMEM + 1,5 % varmeinaktivert føtalt kalveserum
20 ble tilsatt. 15 µL av forbindelse ved 6,7x konsentrasjon ble tilsatt i 60 min., og deretter 10 µL human OSM (Peprotech) ved 33 ng/mL sluttkonsentrasjon.

25 Alle forbindelser ble testet in duplo ved å starte fra 10 µM etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, totalt 8 doser (20 µM – 6,6 µM – 2,2 µM – 740 nM – 250 nM – 82 nM – 27 nM – 9 nM) i en sluttkonsentrasjon på 0,2 % DMSO.

Etter inkubasjon over natten ved 37°C, ble 10 % CO₂-celler lysert i 100 µL lysisbuffer/brønn (PBS, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 5 % trehalose, 0,025 % tergitol NP9, 0,15 % BSA).

5 40 µL cellelysat ble anvendt for å avlese β-galaktosidaseaktivitet ved å tilsette 180 µL βGal-oppløsning (30 µL ONPG 4 mg/mL + 150 µL β-galaktosidasebuffer (0,06 M Na₂HPO₄, 0,04 M NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂)) i 20 min. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 50 µL Na₂CO₃ 1 M. Absorbans ble avlest ved 405 nm.

10 Luciferaseaktivitet ble målt ved å anvende 40 µL cellelysat pluss 40 µL Stedylite® som beskrevet av produsenten (Perkin Elmer), på the Envision (Perkin Elmer).

10 µM av en pan-JAK-inhibitor blandet med en positiv kontroll (100 % inhibering). Som negativ kontroll ble 0,5 % DMSO (0 % inhibering) anvendt. Positive og negative
15 kontroller ble anvendt for å beregne z' og "prosent inhibering" (PIN) verdier.

Prosent inhibering = ((fluorescens bestemt i nærvær av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve med testforbindelse tilstede) dividert med (fluorescens bestemt i nærvær av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve uten trigger))*100 %.

20

PIN-verdier ble plottet for forbindelser testet i doserespons og EC₅₀-verdier ble utledet.

Tabell VII: JAK-STAT-signallering EC₅₀-verdier

25 * > 1001 nM
** 501-1000 nM
*** 101-500 nM
**** 1-100 nM

Forbindelse nr.	EC ₅₀ (nM)
12	***
14	*
15	***
36	***
37	**
57	*
72	*
78	*

92	*
163	*
176	*****
182	*
190	*
192	***
197	***
198	***

Eksempel 2.2 OSM/IL-1 β signalleringsanalyse

OSM og IL-1 β ble vist til synergistisk å oppregulere MMP13-nivåer i human chondrosarkomcellelinje SW1353. Cellene ble utsådd i 96-brønns plater med 15000 celler/brønn i et volum på 120 μ L DMEM (Invitrogen) inneholdende 10 % (volum/volum) FBS og 1 % penicillin/streptomycin (Invitrogen) inkubert ved 37°C 5 % CO₂. Celler ble preinkubert med 15 μ L forbindelse i M199 medium med 2 % DMSO 1 time før triggering med 15 μ L OSM og IL-1 β for å nå 25 ng/mL OSM og 1 ng/mL IL-1 β , og MMP13-nivåer ble målt i kondisjonert medium 48 timer etter triggering. MMP13-aktivitet ble målt ved å anvende en antistoffkaprings-aktivitetsanalyse. For dette formål ble 384 brønnplater (NUNC, 460518, MaxiSorb sort) belagt med 35 μ L av en 1,5 μ g/mL anti-humant MMP13-antistoff (R&D Systems, MAB511) oppløsning i 24 timer ved 4°C. Etter vasking av brønnene to ganger med PBS + 0,05 % Tween, ble de gjenværende bindings seter blokkert med 100 μ L 5 % ikke-fettholdig tørrmelk (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) i PBS i 24 timer ved 4°C. Deretter ble brønnene vasket to ganger med PBS + 0,05 % Tween og 35 μ L av en 1/10 fortynning av kultursupernatant inneholdende MMP13 i 100-ganger fortynnet blokkeringsbuffer ble tilsatt, og inkubert i 4 timer ved romtemperatur. Deretter ble brønnene vasket to ganger med PBS + 0,05 % Tween etterfulgt av MMP13-aktivering ved tilsetning av 35 μ L av en 1,5 mM 4-aminofenylkvikksølvacetat (APMA) (Sigma, A9563) oppløsning, og inkubasjon ved 37°C i 1 time. Brønnene ble igjen vasket med PBS + 0,05 % Tween og 35 μ L MMP13-substrat (Biomol, P-126, OmniMMP fluorogent substrat) ble tilsatt. Etter inkubasjon i 24 timer ved 37°C ble fluorescens for det omdannede substrat målt i en Perkin Elmer Wallac EnVision 2102 Multilabel Reader (bølgelengdeeksitasjon: 320 nm, bølgelengdeemisjon: 405 nm).

Prosent inhibering = ((fluorescens bestemt i nærvær av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve med testforbindelse tilstede) dividert med (fluorescens bestemt i nærvær av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve uten trigger))*100 %.

- 5 * > 1001 nM
 ** 501-1000 nM;
 *** 1-500 nM

Tabell VIII: MMP13 EC₅₀-verdier

Forbindelse nr.	EC ₅₀ (nM)
12	*
15	*
36	**
37	*
57	*
72	**
78	**
163	*
176	***
182	*
192	*
197	*
198	*

10

Eksempel 2.3 PBL proliferasjonsanalyse

15 Lymfocytter fra humant perifert blod (PBL) ble stimulert med IL-2, og proliferasjon ble målt ved å anvende en BrdU innlemmelsesanalyse. PBL ble først stimulert i 72 timer med PHA for å indusere IL-2-reseptor, fastet i 24 timer for å stanse celleproliferasjon, etterfulgt av IL-2-stimulering i ytterligere 72 timer (som inkluderer 24 timer BrdU-merking). Celler ble preinkubert med testforbindelse i 1 time før IL-2-tilsetning. Celler ble dyrket i RPMI 1640 inneholdende 10 % (volum/volum) FBS.

20 **Eksempel 3. In vivo modeller**

Eksempel 3.1 CIA-modell

3.1.1 Materialer

Fullstendig Freund's adjuvans (CFA) og ufullstendig Freund's adjuvans (IFA) ble innkjøpt fra Difco. Bovint kollagen type II (CII), lipopolysakkarid (LPS) og Enbrel, ble oppnådd fra henholdsvis Chondrex (Isle d'Abeau, Frankrike); Sigma (P4252, L'Isle d'Abeau, Frankrike), Whyett (25 mg injiserbar sprøyte, Frankrike) Acros Organics (Palo Alto, CA). Alle andre reagenser som ble anvendt var av reagenskvalitet, og alle løsningsmidler hadde analytisk kvalitet.

3.1.2 Dyr

Mørge Agouti-rotter (hanner, 7-8 uker gamle) ble oppnådd fra Harlan Laboratories (Maison-Alfort, Frankrike). Rotter ble holdt på en 12 timers lys/mørke-syklus (0700-1900). Temperaturen ble holdt ved 22°C, og fôr og vann ble tilveiebrakt ad libitum.

3.1.3 Kollagenindusert artritt (CIA)

En dag før forsøket, ble CII-oppløsning (2 mg/mL) fremstilt med 0,05 M eddiksyre, og lagret ved 4°C. Like før immunisering ble like volumdeler av adjuvans (IFA) og CII blandet ved en homogenisator i en for-avkjølt glassflaske i et isvannbad. Ekstra adjuvans og forlenget homogenisering kan være nødvendig dersom en emulsjon ikke dannes. 0,2 mL av emulsjonen ble injisert intradermalt i halebasen til hver rotte på dag 1, en annen booster intradermal injeksjon (CII-oppløsning ved 2 mg/mL i CFA 0,1 mL saltoppløsning) ble gjennomført på dag 9. Denne immuniseringsmetode ble modifisert fra publiserte metoder (Sims et al., 2004; Jou et al., 2005).

3.1.4 Studiedesign

De terapeutiske effekter av testforbindelsene ble testet i rotte CIA-modellen. Rotter ble tilfeldig delt i like grupper, og hver gruppe inneholdt 10 rotter. Alle rotter ble immunisert på dag 1, og boostet på dag 9. Terapeutisk dosering varte fra dag 16 til dag 30. Den negative kontrollgruppen ble behandlet med vehikkel (MC 0,5 %) og den positive kontrollgruppen med Enbrel (10 mg/kg, 3x uker, s.c.). En forbindelse av interesse ble typisk testet i tre doser, f.eks. 3, 10, 30 mg/kg, p.o.

3.1.5 Klinisk vurdering av artritt

Artritt ble skåret i henhold til metoden av Khachigian 2006, Lin et al. 2007 og Nishida et al. 2004). Svelling av hver av de fire potene ble rangert med artrittskår som følger: 0 – ingen symptomer; 1 – mild, men bestemt rødhet og svelling av én type ledd slik som ankel eller håndledd, eller synlig rødhet og svelling begrenset til individuelle tær, uavhengig av antall rammede tær; 2 – moderat rødhet og svelling av to eller flere

typer av ledd; 3 – alvorlig rødhet og svelling av hele foten som inkluderer tær; 4 – maksimalt betent lem med involvering av flere ledd (maksimal kumulativ klinisk artrittskår 16 pr. dyr) (Nishida et al., 2004).

5 3.1.6 Forandring i kroppsvekt (%) etter inntreden av artritt

Klinisk sett er kroppsvekttap assosiert med artritt (Shelton et al., 2005; Argiles et al., 1998; Rall, 2004; Walsmith et al., 2004). Følgelig kan forandring i kroppsvekt etter inntreden av artritt anvendes som et ikke-spesifikt endepunkt for å evaluere effekten av terapeutika i rottemodellen. Forandringen i kroppsvekt (%) etter inntreden av

10 artritt ble beregnet som følger:

$$\text{Mus: } \frac{\text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 6)} - \text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 5)}}{\text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 5)}} \times 100 \%$$

$$\text{Rotter: } \frac{\text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 4)} - \text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 3)}}{\text{Kroppsvekt}_{(\text{uke } 3)}} \times 100 \%$$

15

3.1.7 Radiologi

Røntgenfotografier ble tatt av bakføttene til hvert individuelle dyr. Et tilfeldig blindidentitetsnummer ble angitt for hvert av fotoene, og alvorligheten av benerosjon ble rangert ved to uavhengige skårer med det radiologiske Larsens skårssystem som

20 følger: 0 – normal med intakte benede konturer, og normalt leddmellomrom; 1 – lett unormalitet hos hvilket som helst eller to av de ytre metatarsalben som viser lett benerosjon; 2 – klar tidlig unormalitet med hvilke som helst tre til fem av de ytre metatarsalben som viser benerosjon, 3 – medum destruktiv unormalitet hvor alle de ytre metatarsalben som velges som hvilke som helst eller to av de indre

25 metatarsalben viser klare benerosjoner; 4 – alvorlig destruktiv unormalitet hvor alle metatarsalbenene viser klar benerosjon, og minst ett av de indre metatarsalledd har fullstendig erodert, og etterlater kun benete leddkonturer som delvis er preservert; 5 – mutilating unormalitet uten benkonturer. Dette skåringssystem er en modifikasjon fra Salvemini et al., 2001; Bush et al., 2002; Sims et al., 2004; Jou et al., 2005.

30

3.1.8 Histologi

Etter radiologisk analyse ble bakføttene til mus fiksert i 10 % fosfatbufret formalin (pH 7,4), dekalsifisert med raskt bendekalsifiseringsmiddel for finhistologi (Laboratories Eurobio) og innesluttet i parafin. For å sikre omfattende evaluering av artrittiske ledd,

35 ble minst fire seriesnitt (5 µm tykkelse) skåret, og hver serie av snitt hadde en avstand på 100 µm. Snittene ble farget med hematoksilin og eosin (H&E). Histologisk undersøkelse for synovial inflammasjon og benskade og bruskskade ble gjennomført

med dobbelt blindtest. I hver fot ble fire parametere vurdert, ved å anvende en fire-punkt skala. Parameterne var celleinfiltrering, pannusalvorlighet, bruskerosjon og benerosjon. Skåring ble gjennomført som følger: 1 – normal, 2 – mild, 3 – moderat, 4 – markert. Disse fire skårer ble oppsummert sammen, og anført som en ytterligere skår, nemlig "RA totalskåren".

3.1.9 Mikro-computertomografi (μ CT) analyser av calcaneus (helben):

Bendegradering observert i RA forekommer særlig i det kortikale ben, og kan vises ved μ CT-analyse (Sims NA et al., 2004; Oste L et al., ECTC Montreal 2007). Etter skanning og 3D volumrekonstruksjon av calcaneusbenet, ble bendegradering målt som antall adskilte objekter tilstede pr. bilde, isolert in silico perpendikulært på benets lengdeakse. Jo mer av benet som var degradert, desto flere adskilte objekter ble målt. 1000 bilder, jevnt fordelt langs calcaneus (avstand omtrent 10,8 μ m), ble analysert.

3.1.10 Resultater

Forbindelse 176 var effektiv ved alle utlesninger gjennomført i rotte CIA-studiet. Statistisk signifikans ble oppnådd for 3 mg/kg i den kliniske skår og fotsvelle-avlesing. Valgte ytterligere forbindelser ble også testet i rotte CIA-studien, sammenligningsforbindelse 36 var aktiv ved 30 mg/kg, sammenligningsforbindelse 37 var aktiv ved 10 mg/kg.

Eksempel 3.2 Septisk sjokk modell

Injeksjon av lipopolysakkarid (LPS) induserer en rask frigivelse av oppløselig tumornekrosefaktor (TNF-alfa) inn i periferien. Denne modell anvendes for å analysere eventuelle blokkere av TNF-frigivelse in vivo.

Seks BALB/cJ hunnmus (20 g) pr. gruppe ble behandlet ved den tiltenkte dosen én gang, p.o. Tretti minutter senere ble LPS (15 μ g/kg; E. coli serotyp 0111:B4) injisert i.p. Nitti minutter senere ble mus avlivet, og blod ble samlet. Sirkulerende TNF alfanivåer ble bestemt ved å anvende kommersielt tilgjengelige ELISA-kit. Deksametason (5 μ g/kg) ble anvendt som en referanse anti-inflammatorisk forbindelse. Valgte forbindelser testes i én eller flere doser, f.eks. 3 og/eller 10 og/eller 30 mg/kg, p.o.

Forbindelse 176 utviste en statistisk signifikant reduksjon i TNF-frigivelsen (> 50 %) ved 3, 10 og 30 mg/kg p.o.

Valgte ytterligere forbindelser ble også testet i den septiske sjokkmodellen, sammenligningsforbindelse 36 var aktiv ved 30 mg/kg, sammenligningsforbindelsene 37 og 197 var aktive ved 3 mg/kg.

5 *Eksempel 3.3 MAB-modell*

MAB-modellen tillater en rask vurdering av moduleringen av en RA-liknende inflammatorisk respons ved terapeutika (Kachigian LM. Nature Protocols (2006) 2512-2516: Collagen antibody-induced arthritis). DBA/J-mus ble injisert i.v. med en cocktail av mAb'er rettet mot kollagen II. En dag senere ble forbindelsesbehandling initiert (vehikkel: 10 % (volum/volum) HPβCD). Tre dager senere mottok mus en i.p. LPS-injeksjon (50 µg/mus), resulterende i en rask inflammasjonsinntreden. Forbindelsesbehandling ble fortsatt inntil ti dager etter mAb-injeksjon. Inflammasjon ble avlest ved å måle fotsvelling, og registrere den kliniske skår for hver fot. Den kumulative kliniske artrittskår for fire lemmer ble presentert for å vise alvorligheten av inflammasjon. Et skåringssystem anvendes for hvert lem ved å anvende en skala fra 0-4, hvor 4 er den mest alvorlige inflammasjon.

- | | |
|----|--|
| 0 | Symotomfri |
| 1 | Mild, men klar rødhet og svelling av én type av ledd slik som ankel eller |
| 20 | vrist, eller synlig rødhet og svelling begrenset til individuelle tær, uavhengig av antall rammede tær |
| 2 | Moderat rødhet og svelling av to eller flere typer av ledd |
| 3 | Alvorlig rødhet og svelling av hele foten som inkluderer tær |
| 4 | Maksimalt betent lem som involverer flere ledd |

25

Forbindelse 176, dosert p.o. ved 10 og 30 mg/kg, reduserte den kliniske skår med statistisk signifikans ved 30 mg/kg, og reduserte signifikant inflammasjon ved både 10 og 30 mg/kg doser.

30 Valgte ytterligere sammenligningsforbindelser ble også testet i MAB-modellen, sammenligningsforbindelser 36 og 37 var aktive ved 30 mg/kg.

Eksempel 3.4 Onkologimodeller

In vivo modeller for å validere effektivitet av små molekyler mot JAK2-drevne myeloproliferative sykdommer er beskrevet av Werning et al. Cancer Cell 13, 311, 2008 og Geron et al. Cancer Cell 13, 321, 2008.

35

Eksempel 3.5 Mus IBD-modell

In vitro og in vivo modeller for å validere effektivitet av små molekyler mot IBD er beskrevet av Wirtz et al. 2007.

5 *Eksempel 3.6 Mus astmamodell*

In vitro og in vivo modeller for å validere effektivitet av små molekyler mot astma er beskrevet av Nials et al., 2008; Ip et al., 2006; Pernis et al., 2002; Kudlacz et al., 2008.

10 **Eksempel 4: Toksisitet, DMPK og sikkerhetsmodeller***Eksempel 4.1 Termodynamisk solubilitet*

En oppløsning av 1 mg/mL av testforbindelsen fremstilles i en 0,2 M fosfatbuffer pH 7,4 eller en 0,1 M sitratbuffer pH 3,0 ved romtemperatur i en glassampulle.

15 Prøvene roteres i en Rotator drive STR 4 (Stuart Scientific, Bibby) ved hastighet 3,0 ved romtemperatur i 24 timer.

Etter 24 timer overføres 800 µL av prøven til et eppendorfrør og sentrifugeres i 5 min. ved 14000 rpm. 200 µL av supernatanten i prøven ble deretter overført til en
 20 MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50), og supernatanten filtreres (10-12" Hg) ved hjelp av en vakuum manifold inn i en ren Greiner polypropylen V-bunn 96-brønns plate (kat.nr. 651201). 5 µL av filtratet fortynnes inn i 95 µL (F20) av den samme bufferen anvendt for å inkubere i platen som inneholdt standardkurven (Greiner, kat.nr. 651201).

25 Standardkurven for forbindelsen fremstilles i nylaget DMSO ved å starte fra en 10 mM DMSO fortynnet faktor 2 stamoppløsning i DMSO (5000 µM) og ble deretter ytterligere fortynnet i DMSO opp til 19,5 µM. 3 µL av fortynningsserien som fra 5000 µM overføres deretter til en 97 µL acetonitrilbufferblanding (50/50).

30 Sluttkonsentrasjonsområdet er fra 2,5 til 150 µM.

Platen ble forseglet med forseglingsmatter (MA96RD-04S, www.kinesis.co.uk) og prøver måles ved romtemperatur på LCMS (ZQ 1525 fra Waters) under optimaliserte betingelser ved å anvende Quanoptimize for å bestemme den passende massen til
 35 molekylet.

Prøvene ble analysert på LCMS med en strømningshastighet på 1 mL/min. Løsningsmiddel A er 15 mM ammoniakk, og løsningsmiddel B er acetonitril. Prøven kjøres under positiv ionspray på en XBridge C18 3,5 μ M (2,1 x 30 mm) kolonne fra Waters. Løsningsmiddelgradienten har en total gjennomkjøringstid på 2 min., og
 5 strekker seg fra 5 % B til 95 % B.

Topparealer analyseres ved hjelp av Masslynx software pakke og topparealer av prøvene plottes mot standardkurven for å oppnå forbindelsens solubilitet.

10 Solubilitetsverdier er rapportert i μ M eller μ g/mL.

Eksempel 4.2 Vandig oppløselighet

Ved å starte fra en 10 mM stamoppløsning i DMSO, fremstilles en seriefortynning av forbindelsen i DMSO. Fortynningsserien overføres til en 96 NUNC Maxisorb plate F-bunn (kat. nr. 442404) og 0,2 M fosfatbuffer pH 7,4 eller 0,1 M sitratbuffer pH 3,0 ved
 15 romtemperatur tilsettes.

Sluttkonsentrasjonen strekker seg fra 200 μ M til 2,5 μ M i fem like fortynningstrinn. Den endelige DMSO-konsentrasjonen overskred ikke 2 %. 200 μ M pyren tilsettes til
 20 hjørnepunkter i hver 96-brønns plate, og tjener som et referansepunkt for kalibrering av Z-aksen på mikroskopet.

Analyseplater forsegles og inkuberes i 1 time ved 37°C under rysting ved 230 rpm. Platene skannes deretter under et hvitt lys mikroskop som gir individuelle bilder av
 25 presipitatet pr. konsentrasjon. Presipitatet analyseres og omdannes til et tall som plottes på en kurve. Den første konsentrasjonen hvorved forbindelsen fremstår fullstendig oppløst er konsentrasjonen som rapportert, men den sanne konsentrasjonen ligger imidlertid noe mellom denne konsentrasjon og ett
 fortynningstrinn høyere.

30 Solubilitetsverdier er rapportert i μ g/mL.

Eksempel 4.3 Plasmaproteinbinding (likevektsdialyse)

En 10 mM stamoppløsning av forbindelsen i DMSO fortynnes med en faktor 5 i DMSO.
 35 Denne oppløsning fortynnes ytterligere i nylaget tint humant, rotte, mus eller hundeplasma (BioReclamation INC) med en sluttkonsentrasjon på 10 μ M og en endelig

DMSO-konsentrasjon på 0,5 % (5,5 µl i 1094,5 µl plasma i en PP-Masterblock 96-brønn (Greiner, kat.nr. 780285)).

En Pierce Red Device plate med innlegg (ThermoScientific, kat.nr. 89809) er fremstilt
 5 som fylles med 750 µL PBS i bufferkammeret, og 500 µL av det anrikede plasma i plasmakammeret. Platen inkuberes i fire timer ved 37°C under rysting ved 230 rpm. Etter inkubasjon overføres 120 µL i begge kamre til 360 µL acetonitril i en 96-brønns rundbunnet, PP dyp-brønnplate (Nunc, kat.nr. 278743) og forsegles med et lokk av aluminiumfolie. Prøvene blandes og plasseres på is i 30 min. Denne platen
 10 sentrifugeres deretter i 30 min. ved 1200 rcf ved 4°C, og supernatanten overføres til en 96-v-bunn PP-plate (Greiner, 651201) for analyser på LCMS.

Platen forsegles med forseglingsmatter (MA96RD-04S) av www.kinesis.co.uk, og prøver måles ved romtemperatur på LCMS (ZQ 1525 fra Waters) under optimerte
 15 betingelser ved anvendelse av Quanoptimize for å bestemme den passende massen til molekylet.

Prøvene analyseres på LCMS med en strømningshastighet på 1 mL/min. Løsningsmiddel A var 15 mM ammoniakk, og løsningsmiddel B var acetonitril. Prøven
 20 ble kjørt under positiv ion spray på en XBridge C18 3,5 µM (2,1 x 30 mm) kolonne fra Waters. Løsningsmiddelgradienten hadde en total gjennomkjøringstid på 2 minutter, og strakk seg fra 5 % B til 95 % B.

Toppareal fra forbindelsen i bufferkammeret og plasmakammeret ble ansett til å være
 25 100 % forbindelse. Prosentandel bundet til plasma ble avledet fra disse resultater, og ble rapportert til LIMS som prosentandel bundet til plasma.

Solubiliteten av forbindelsen i den endelige testkonsentrasjonen i PBS ble inspisert med mikroskop for å indikere om presipitering observeres eller ikke.

30

Eksempel 4.4 Tilbøyelighet for QT-prolongering

Potensial for QT-prolongering ble vurdert i hERG "patch clamp"-analysen.

4.4.1 Konvensjonell helcelle "patch-clamp"

35 Helcelle "patch-clamp" målinger ble gjennomført ved å anvende en EPC10 forsterker som styres ved Pulse v8.77 software (HEKA). Seriemotstand var typisk mindre enn 10 MΩ, og kompenserte ved større enn 60 %, avlesninger ble ikke lekkasjesubtrahert.

Elektroder ble produsert fra GC150TF pipetteglass (Harvard), motstand mellom 2 og 3 MΩ.

5 Den eksterne badeoppløsning inneholdt: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM glukose, 10 mM HEPES, pH 7,4.

10 Den interne "patch" pipetteoppløsning inneholdt: 100 mM Kglukonat, 20 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM Na₂ATP, 2 mM glutation, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2.

Legemidler ble underkastet perfusjon ved anvendelse av et Biologic MEV-9/EVH-9 rapid perfusjonssystem.

15 Alle registreringer ble utført på HEK293-celler som stabilt uttrykker hERG-kanaler. Celler ble dyrket på 12 mm runde dekkglass (German glass, Bellco) festet i registreringskammeret ved anvendelse av to platinastaver (Goodfellow). hERG-strømmer ble fremkalt ved å anvende en aktiverende puls til +40 mV i 1000 ms, etterfulgt av en sluttstrømpuls til -50 mV i 2000 ms, holdepotensialet var -80 mV. Pulser ble påført hvert 20. sekund, og alle forsøk ble gjennomført ved romtemperatur.

20

4.4.2 Dataanalyser

25 IC₅₀- og IC₂₀-verdier ble beregnet for hver testet forbindelse. Ganger forskjell mellom IC₂₀ og de ubundne C_{max}-konsentrasjoner for testforbindelsen oppnådd ved relevante terapeutiske doser som bestemt ved resultater oppnådd fra rotte CIA-modellen ble beregnet.

For konsentrasjonsresponskurver, ble topp-sluttstrøm amplitude målt under spenningstrinn til -50 mV. Kurvetilpasning av konsentrasjonsresponsdata ble gjennomført ved å anvende ligningen:

30

$$y = a + [(b-a)/(1+10^{((\log c-x)d})}]$$

35 hvor a er minimumsresponsen, b er maksimumrespons, og d er Hill slope, denne ligning kan anvendes for å beregne både IC₅₀ (hvor y = 50 og c er IC₅₀-verdien) og IC₂₀ (hvor y = 20 og c er IC₂₀-verdien). GraphPad® Prism® (Graphpad® Software Inc.) software ble anvendt for all kurvetilpasning.

Tabell IX nedenfor oppsummerer resultatene som oppnådd for de valgte forbindelsene som ble testet.

Tabell IX

Forbindelse	Dose	Ganger forskjell
37	10	7
176	3	137
176	10	82

5

En forskjell på 100 ganger eller større indikerer et lavt potensial for QT forlengelse. Det kan derfor ses at sammenlignet med forbindelse 37, har forbindelse 176 en mye lavere mulig QT forlengelse.

10

Eksempel 4.5 Mikrosomal stabilitet

En 10 mM stamløsning av forbindelse i DMSO ble fortynnet 1000 ganger i en 182 mM fosfatbuffer pH 7,4 i en 96 dypbrønnsplate (Greiner, kat.nr. 780285) og forinkuberes ved 37°C.

15

40 µL deionisert vann tilsettes til en brønn av et propylen Matrix 2D strekkodemerket lagringsrør (Thermo Scientific) og forinkuberes ved 37°C.

20

En glukose-6-fosfat-dehydrogenase (G6PDH) arbeidsstamopløsning ble fremstilt i 182 mM fosfatbuffer pH 7,4, og ble plassert på is før bruk. En ko-faktor inneholdende MgCl₂, glukose-6-fosfat og NADP⁺ ble fremstilt i deionisert vann og plassert på is før bruk.

25

En endelig arbeidsoppløsning som inneholdt levermikrosomer (Xenotech) av en art av interesse (menneske, mus, rotte, hund), tidligere beskrevet G6PDH og ko-faktorer ble fremstilt, og denne blanding ble inkubert for høyst 20 minutter ved romtemperatur.

30

30 µL av den forvarmede forbindelsesfortynning ble tilsatt til 40 µL av forvarmet vann i matriksrør, og 30 µL av den mikrosomale blanding ble tilsatt. Endelige reaksjonskonsentrasjoner var 3 µM forbindelse, 1 mg mikrosomer, 0,4 U/mL G6PDH, 3,3 mM MgCl₂, 3,3 mM glukose-6-fosfat, og 1,3 mM NADP⁺.

For å måle prosentandel igjen av forbindelse på tidspunktet null, ble MeOH eller ACN tilsatt (1:1) til brønnen før tilsetning av den mikrosomale blanding. Platene ble forseglest med Matrix Sepra forseglingsmatter (Matrix, kat.nr. 4464), og ble rystet i noen få sekunder for å sikre fullstendig blanding av alle komponenter.

5

Prøvene som ikke ble stanset inkuberes ved 37°C, 300 rpm, og etter 1 times inkubasjon ble reaksjonen stanset med MeOH eller ACN (1:1).

10

Etter stans av reaksjonen ble prøvene blandet og plassert på is i 30 min. for å presipitere proteiner. Platene ble deretter sentrifugert i 30 min. ved 1200 rcf ved 4°C, og supernatanten ble overført til en 96-v-bunn PP-plate (Greiner, 651201) for analyser på LCMS.

15

Disse plater ble forseglest med forseglingsmatter (MA96RD-04S) fra www.kinesis.co.uk og prøver ble målt ved romtemperatur på LCMS (ZQ 1525 fra Waters) under optimaliserte betingelser, ved anvendelse av Quanoptimize for å bestemme den passende massen til modermolekylet.

20

Prøvene ble analysert på LCMS med en strømningshastighet på 1 mL/min. Løsningsmiddel A var 15 mM ammoniakk, og løsningsmiddel B var metanol eller acetonitril, avhengig av den anvendte stoppoppløsning. Prøvene ble kjørt under positiv ionspray på en XBridge C18 3,5 µm (2,1 x 30 mm) kolonne fra Waters. Løsningsmiddelgradienten hadde en total gjennomkjøringstid på 2 minutter, og strekker seg fra 5 % B til 95 % B.

25

Toppareal fra moderforbindelsen ved tiden 0 ble betraktet til å være 100 % gjenværende. Prosentandel gjenværende etter 1 times inkubasjon ble beregnet fra tid 0, og ble beregnet som prosentandelen gjenværende. Solubiliteten av forbindelsen i den endelige testkonsentrasjonen i buffer undersøkes ved mikroskop og resultater rapporteres.

30

Dataene for mikrosomal stabilitet uttrykkes som en prosentandel av den totale mengde av forbindelse som er gjenværende etter 60 minutter.

35

Tabell X – Mikrosomal stabilitet

Forbindelse nr.	Human (%)	Rotte (%)
12	70	94
14		
15	43	14
36	11,65	72,41
37	70,98	79,47
38		
57	42,75	34,5
72	4,88	2,2
78	78,21	93,85
92	30,21	23,6
127		
163	53,64	39,78
165		
167		
174		
176	157,1	90,21
182	19,33	19,23
190	2,13	25,64
192	127,2	77,62
197	46,6	59,41
198	65,8	72,45

Eksempel 4.6 Caco2 permeabilitet

5 Toveis Caco-2-analyser ble gjennomført som beskrevet nedenfor. Caco-2-celler ble oppnådd fra European Collection of Cell Cultures (ECACC, kat. 86010202) og anvendt etter en 21 dagers celledyrking i 24-brønns Transwell-plater (Fisher TKT-545-020B).

2x10⁵ celler/brønn ble utsådd i utsåingsmedium bestående av DMEM + GlutaMAXI + 1
 10 % NEAA + 10 % FBS (FetalClone II) + 1 % Pen/strep. Mediet ble forandret hver andre til tredje dag.

Testforbindelser og referanseforbindelser (propanolol og rodamin123 eller vinblastin, alle innkjøpt fra Sigma) ble fremstilt i Hanks balanserte saltoppløsning inneholdende
 15 25 mM HEPES (pH 7,4), og tilsatt enten til de apikale (125 µL) eller basolaterale (600

µL) kamre av Transwell-platesammenstillingen ved en konsentrasjon på 10 µM med en endelig DMSO-konsentrasjon på 0,25 %.

5 50 µM Lucifer Yellow (Sigma) ble tilsatt til donorbufferen i alle brønner for å fastslå integritet av cellelag ved å måle Lucifer Yellow permeering. Da Lucifer Yellow (LY) ikke fritt kan permeere lipofile barrierer, vil en høy grad av LY-transport indikere dårlig integritet av cellelaget.

10 Etter 1 times inkubasjon ved 37°C under rysting i en orbital ryster ved 150 rpm, ble 70 µL prøver tatt fra både apikale (A) og basale (B) kamre, og tilsatt til 100 µL i 50:50 acetonitril:vann-oppløsning, inneholdende analytisk intern standard (0,5 µM karbamazepin) i en 96-brønns plate.

15 Lucifer Yellow ble målt med et Spectramax Gemini XS (Ex 426 nm og Em 538 nm) i en ren 96-brønns plate inneholdende 150 µL væske fra basolateral og topp-side.

Konsentrasjoner av forbindelse i prøvene ble målt ved høytytelses-væskechromatografi/massespektroskopi (LC-MS/MS).

20 Tilsynelatende permeabilitet (P_{app}) verdier ble beregnet ut fra sammenhengen:

$$P_{app} = \frac{[\text{forbindelse}]_{\text{akseptor endelig}} \times V_{\text{akseptor}}}{([\text{forbindelse}]_{\text{donor initial}} \times V_{\text{donor}}) / T_{\text{inc}} \times V_{\text{donor}}} \times \frac{1}{\text{overflateareal} \times 60 \times 10^{-6} \text{ cm/s}}$$

V = kammervolum

T_{inc} = inkubasjonstid

25 Overflateareal = 0,33 cm²

Effluxks-forholdene, som en indikasjon på aktiv effluks fra apikalcelleoverflaten, ble beregnet ved å anvende forholdet $P_{app} B > A / P_{app} A > B$.

30 De etterfølgende analyseakseptanskriterier ble anvendt:

Propanolol: $P_{app}(A > B)$ verdi $\geq 20 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$

Rodamin 123 eller vinblastin: $P_{app}(A > B)$ verdi $< 5 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$ med effluksforhold ≥ 5

Lucifer Yellow permeabilitet: $\leq 100 \text{ nm/s}$

Tabell XI – Caco2 effluksrate

Forbindelse nr.	$P_{app} A>B$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Effluksforhold
12	23,3	0,82
15	25,8	0,91
36	36,55	0,89
37	23	0,85
72	14,93	1,31
78	2	1,5
163	13,4	0,85
176	10,6	0,8
192	12,5	2

Eksempel 4.7 Farmakokinetikkstudie I gnagere5 **4.7.1 Farmakokinetikkstudie**

Forbindelser formuleres i PEG200/fysiologisk saltvannsblandinger eller PEG400/DMSO/fysiologisk saltvannsblandinger for den intravenøse rute, og i 0,5 % metylcellulose eller 10-30 % hydroksypropyl- β -syklodekstrin pH 3 eller pH 7,4 for den orale rute. Testforbindelsene ble dosert oralt som en enkel øsofagus sondeføring med 10 5-10 mg/kg, og dosert intravenøst med bolus via kaudalvenen med 1 mg/kg. Hver gruppe består av tre rotter. Blodprøver ble samlet via enten jugularvenen ved å anvende rotter utstyr med kanyler, eller i retroorbital sinus med litiumheparin som anti-koagulasjonsmiddel på tidspunktene i det etterfølgende området: 0,05-8 timer (intravenøs rute), og 0,25-6 eller 24 timer (oral rute). Prøver av fullblod sentrifugeres 15 ved 5000 rpm i 10 minutter, og de oppnådde plasmaprøver lagres ved -20°C i påvente av analyse.

4.7.2 Kvantifisering av forbindelsesnivåer i plasma

Plasmakonsentrasjoner av hver testforbindelse bestemmes ved en LC-MS/MS-metode 20 hvor massespektrometeret opereres i positiv elektropraymodus.

4.7.3 Bestemmelse av farmakokinetikkparametre

Farmakokinetikkparametre beregnes ved å beregne Winnonlin® (Pharsight®, United

25 **Eksempel 4.8 7-dag rottetoksisitetsstudie**

En 7-dag oral toksisitetsstudie med testforbindelser ble gjennomført i Sprague-Dawley hannrotter for å vurdere deres toksiske potensial og toksikokinetikker, ved daglige

doser på 100, 300 og 500 mg/kg/dag, ved sondefôring, ved konstant doseringsvolum på 5 mL/kg/dag.

5 Testforbindelsene ble formulert i 30 % (volum/volum) HP β CD i rensset vann. Hver gruppe inkluderte 5 viktige hannrotter så vel som 3 satellittdyr for toksikokinetikker. En fjerde gruppe ble gitt 30 % (volum/volum) HP β CD i kun vann, ved den samme frekvens, doseringsvolum og ved den samme administreringsrute og virket som vehikkelkontrollgruppen.

10 Målet for studien var å bestemme den laveste dose som resulterte i at ingen bivirkninger ble identifisert ("no observable adverse effect level" – NOAEL). Sammenligningsforbindelse 37 og forbindelse 176 ble testet i denne protokollen.

15 NOAEL-nivåene for sammenligningsforbindelse 37 og forbindelse 176 ble begge estimert ved 500 mg/kg.

20 Det vil forstås av de fagkyndige på området at den foregående beskrivelse er angitt i eksemplifiserende hensikt, og er forklarende av natur som indikert, og skal illustrere oppfinnelsen og dens foretrukne utførelsesformer. Gjennom rutineforsøk, vil en fagkyndig se tilsynelatende modifikasjoner og variasjoner som kan gjennomføres uten at man avviker fra oppfinnelse sideen. Oppfinnelsen skal således ikke defineres ved den ovennevnte beskrivelse, men ved hjelp av de etterfølgende krav og deres ekvivalenter.

25 REFERANSER

Choy EH, Panayi GS. (2001). N Engl J Med. 344: 907-16.

Chubinskaya S and Kuettner KE (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. The international journal of biochemistry & cell biology 35(9)1323-1340.

- Clegg DO *et al.* (2006) *N Engl J Med.* 2006 354:795-808. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis.
- Firestein GS. (2003). *Nature.* 423:356-61.
- Kachigian LM. (2006) Collagen antibody-induced arthritis, *Nature Protocols* 2512-2516:
- Lee DM, Weinblatt ME (2001). *Lancet.* 358: 903-11.
- Legendre F, Dudhia J, Pujol J-P, Bogdanowicz P. (2003) JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 278(5):2903-2912.
- Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. (2001) Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires janus kinase/STAT signaling pathway. (2001) *J Immunol* 166:3491-3498.
- O'Dell JR. (2004) Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 350(25):2591-602.
- Osaki M, Tan L, Choy BK, Yoshida Y, Cheah KSE, Auron PE, Goldring MB. (2003) The TATA-containing core promoter of the type II collagen gene (COL2A1) is the target of interferon-gamma-mediated inhibition in human chondrocytes: requirement for STAT1alpha, JAK1 and JAK2. *Biochem J* 369:103-115.
- Oste L *et al.*, ECTC Montreal 2007: A high throughput method of measuring bone architectural disturbance in a murine CIA model by micro-CT morphometry
- Otero M, Lago R, Lago F, Gomez Reino JJ, Gualillo O. (2005) Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Research & Therapy* 7:R581-R591.
- Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM, Schreiber RD. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the jaks in cytokine-induced biologic responses *Cell* 93: 373-383.
- Sims NA *et al.*, (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum.* 50 2338-2346:
- Smolen JS, Steiner G. (2003). *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-88.
- Wernig *et al.* (2008) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, *Cancer Cell* 13(4), 311-320
- Geron *et al.* (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors *Cancer Cell* 13 (4), 321-30
- Wicland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. (2005). *Nat Rev Drug Discov.* 4:331-44. Osteoarthritis - an untreatable disease?
- Wirtz *et al.* (2007) Mouse Models of Inflammatory Bowel Disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1073-1083:

- Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383
- Constantinescu et al., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131
- Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadamitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 3):S233-S242
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., *Nature Reviews*, 2004, 555-564
- Nials *et al.* (2008) *Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, Disease Models & Mechanisms*, 213-220.
- Ip *et al.* (2006) Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways, *Clin. Exp. Immun.*, 162-172.
- Pernis et al. (2002) JAK-STAT signaling in asthma *J. Clin. Invest.* 1279.
- Kudlacz et al. (2008) The JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent anti-inflammatory agent in a murine model of pulmonary eosinophilia, *Eur J Pharmacol* 154-161.
- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen I-M, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willman CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, *PNAS* May 22. [Epub ahead of print]
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. (1998) Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1:245-51.
- Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. (2002) Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 46: 802-5.
- Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, Wu CL. (2005) Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52:339-44.
- Nishida K, Komiya T, Miyazawa S, Shen ZN, Furumatsu T, Doi H, Yoshida A, Yamana J, Yamamura M, Ninomiya Y, Inoue H, Asahara H. (2004) Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.* 10: 3365-76.
- Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*; 10:1219-23.
- Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Serrano I, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. (2001) Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 44:2909-21.

- Shelton DL, Zeller J, Ho WH, Pons J, Rosenthal A. (2005) Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain*. 116:8-16.
- Sims NA, Green JR, Glatt M, Schliet S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50: 2338-46.
- Walsmith J, Abad L, Kehayias J, Roubenoff R. (2004) Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*; 31:23-9.
- Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) *Nature Protocols* 1, 2512-6.
- Lin HS, Hu CY, Chan HY, Liew YY, Huang HP, Lepescheux L, Bastianelli E, Baron R, Rawadi G, Clément-Lacroix P. (2007) Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in vivo in collagen-induced arthritis in rodents. *Br J Pharmacol.* Apr;150 (7):829-31.

Alle publikasjoner som inkluderer, men som ikke er begrenset til, patenter og patentsøknader som angitt i denne beskrivelse er innlemmet heri ved referanse som om hver individuelle publikasjon var spesifikt og individuelt indikert til å være

5 innlemmet ved referanse heri.

Fra den foregående beskrivelse vil forskjellige modifikasjoner og forandringer i preparater og metoder ifølge oppfinnelsen fremgå for de fagkyndige på området. Alle slike modifikasjoner er innenfor rammen av de vedlagte kravene, og skal være

10 inkludert deri.

Det skal forstås at faktorer slik som differensiell cellepenetreringskapasitet for forskjellige forbindelser kan bidra til uoverenstemmelse mellom aktiviteten til forbindelsene i in vitro biokjemiske og cellulære analyser.

15

Minst noen av de kjemiske navn til forbindelsene ifølge oppfinnelsen som gitt og angitt i denne søknad, kan være dannet på et automatisert grunnlag ved anvendelse av et kommersielt tilgjengelig kjemisk dataprogram for navngivning, og er ikke blitt verifisert uavhengig. Representative programmer for å gjennomføre denne funksjonen

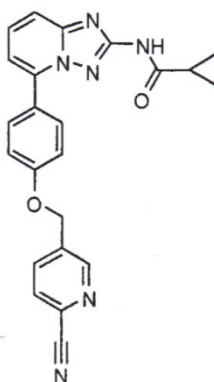
20 inkluderer Lexichem navngivningsverktøy som selges av Open Eye Software, Inc., og autonom software verktøy solgt av MDL, Inc. I det tilfellet hvor det indikerte kjemiske navn og den angitte struktur er forskjellig, vil den angitte struktur regulere.

Kjemiske strukturer som vist her ble fremstilt ved anvendelse av enten ChemDraw® eller ISIS®/DRAW. Enhver åpen valens som fremgår på et karbonatom, oksygenatom eller nitrogenatom i strukturene her indikerer tilstedeværelse av et hydrogenatom.

25 Der hvor et chiralt senter eksisterer i en struktur, men ingen spesifikk stereokjemi er vist for det chirale senter, er begge enantiomerer som er forbundet med den chirale struktur omfattet.

PATENTKRAV

1. Forbindelse ifølge formel VIa:



VIa

- 5 eller et farmasøytisk aksepterbart salt derav.
2. Farmasøytisk preparat omfattende en farmasøytisk aksepterbart bærer og en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse ifølge krav 1.
- 10 3. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament.
4. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk preparat ifølge krav 2, for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller
- 15 tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som
- 20 involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabole stimulering av chondrocytter), medfødte brusk misdannelser, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6 og transplantatavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning).
- 25 5. Forbindelse ifølge krav 1, eller et farmasøytisk preparat ifølge krav 2, for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av proliferative sykdommer.

6. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling, forebygging eller profylakse av sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering, f.eks. osteoartritt; og/eller tilstander som involverer inflammasjon eller immunresponser, slik som Crohns sykdom, reumatoid artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), juvenil idiopatisk artritt, kolitt, inflammatoriske tarmsykdommer, endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypassinngrep eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover (f.eks. sykdommer som involverer den anabole stimulering av chondrocytter), medfødte brusk misdannelser, sykdommer assosiert med hypersekresjon av IL6, og transplantatavstøtning (f.eks. organtransplantatavstøtning).
7. Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av proliferative sykdommer.
8. Farmasøytisk preparat ifølge krav 2, som omfatter ett eller flere andre aktive midler.
9. Forbindelse ifølge krav 4 eller 5, for anvendelse i kombinasjon med ett eller flere andre aktive midler.
10. Anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 3, 6 eller 7, hvor medikamentene er for administrering med ett eller flere andre aktive midler.
11. Farmasøytisk preparat ifølge krav 8, forbindelse ifølge krav 9, eller anvendelse ifølge krav 10, hvor det ene eller de flere andre aktive midler er terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av en sykdom som involverer inflammasjon, artritt, proliferative lidelser, autoimmune sykdommer, transplantatavstøtning, astma og/eller rinitt og/eller COPD, IBD, SLE eller psoriasis.
12. Farmasøytisk preparat, forbindelse eller anvendelse ifølge krav 11, hvor det ene eller de flere andre aktive midler er terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av en sykdom som involverer inflammasjon valgt fra immunregulerende midler, f.eks. azatioprin, kortikosteroider (f.eks. prednisolon eller deksametason), syklofosfamid, cyklosporin A, takrolimus, mykofenolat, mofetil, muromonab-CD3 (OKT3), ATG, aspirin, acetaminofen, ibuprofen, naproksen og piroksikam; terapeutiske

midler for behandling og/eller forebygging av artritt valgt fra analgesika, ikke-steroider antiinflammatoriske legemidler (NSAIDS), steroider, syntetiske DMARDS (f.eks. metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, auranofin, natriumaurotiomalat, penicillamin, klorokin, hydroksyklorokin, azatioprin og cyklosporin), og biologiske DMARDS (f.eks. Infiximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab og Abatacept); terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av proliferative lidelser valgt fra metotreksat, leukovorin, adriamycin, prenison, bleomycin, syklofosamid, 5-fluoruracil, paclitaxel, docetaxel, vincristin, vinblastin, vinorelbin, doksorubisin, tamoksifen, toremifen, megestrolacetat, anastrozol, goserelin, anti-HER2 monoklonalt antistoff, kapecitabin, raloksifenhydroklorid, EGFR-inhibitorer, VEGF-inhibitorer, proteasom-inhibitorer og hsp90-inhibitorer (f.eks. 17-AAG); terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av autoimmune sykdommer valgt fra glukokortikoider, cytostatiske midler (f.eks. purinanaloger), alkyleringsmidler (f.eks. nitrogen-mustards (syklofosamid), nitrosoureaforbindelser og platinaforbindelser), antimetabolitter (f.eks. metotreksat, azatioprin og merkaptopurin), cytotoksiske antibiotika (f.eks. daktinomycin, antrasykliner, mitomycin C, bleomycin og mitramycin), antistoffer (f.eks. anti-CD20, anti-CD25 eller anti-CD3 (OTK3) monoklonale antistoffer), cyklosporin, takrolimus, rapamycin (sirolimus), interferoner (f.eks. IFN- β), TNF bindingsproteiner (f.eks. infliximab, etanercept eller adalimumab), mykofenolat, fingolimod og myriocin; terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av transplantatavstøtning valgt fra kalsinurininhibitorer (f.eks. cyklosporin eller takrolimus (FK506)), mTOR-inhibitorer (f.eks. sirolimus, everolimus), anti-proliferative midler (f.eks. azatioprin, mykofenolsyre), kortikosteroider (f.eks. prednisolon, hydrokortison), antistoffer (f.eks. monoklonale anti-IL-2R α -reseptorantistoffer, basiliximab, daklizumab), og polyklonale anti-T-celle-antistoffer (f.eks. anti-tymocytglobulin (ATG), anti-lymfocytglobulin (ALG)); terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av astma og/eller rinitt og/eller COPD valgt fra β_2 -adrenoceptoragonister (f.eks. salbutamol, levabuterol, terbutalin og bitolterol), epinefrin (inhalert eller tabletter), anticholinerge midler (f.eks. ipratropiumbromid), glukokortikoider (oral eller inhalert), lengevirkende β_2 -agonister (f.eks. salmeterol, formoterol, bambuterol og oral albuterol med opprettholdt frigivelse), kombinasjoner av inhalerte steroider og lengevirkende bronkodilatorer (f.eks. flutikason/salmeterol, budesonid/formoterol), leukotrienantagonister og synteseinhibitorer (f.eks. montelukast, zafirlukast og zileuton), inhibitorer av mediatorfrigivelse (f.eks. kromglykat og ketotifen), biologiske regulatorer av IgE-respons (f.eks. omalizumab), antihistaminer (f.eks. ceterizin, cinnarizin, feksofenadin), og vasokonstriktorer (f.eks. oksymetazolin, xylometazolin, nafazolin og tramazolin; terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av

IBD valgt fra glukokortikoider (f.eks. prednison, budesonid), syntetiske sykdomsmodifiserende, immunmodulerende midler (f.eks. metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, mesalazin, azatioprin, 6-merkaptopurin og ciklosporin) og biologiske sykdomsmodifiserende immunmodulerende midler (influximab, adalimumab, rituximab og abatacept); terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av SLE valgt fra sykdomsmodifiserende antireumatiske legemidler (DMARD'er) slik som antimalariamidler (f.eks. plaquenil, hydroksyklorokin), immunsuppresjonsmidler (f.eks. metotreksat og azatioprin), syklofosfamid og mykofenolsyre, immunsuppresjonslegemidler og analgesika, slik som ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler, opiater (f.eks. dekstropropoksyfen og ko-kodamol), opioider (f.eks. hydrokodon, oksykodon eller metadon) og fentanyl "duragesic" transdermalt plaster; eller terapeutiske midler for behandling og/eller forebygging av psoriasis valgt fra topiske behandlinger slik som badeoppløsninger, fuktighetsmidler, medisinerete kremer og salver inneholdende kulltjære, ditranol (antralin), kortikosteroider slik som desoksimetason, fluocinonid, vitamin D₃-analoger (f.eks. kalsipotriol), arganolje og retinoider (etretinat, acitretin, tazaroten), systemiske behandlinger slik som metotreksat, cyklosporin, retionoider, tioguanin, hydroksyurea, sulfasalazin, mykofenolat mofetil, azatioprin, takrolimus, fumarsyreestere og biologiske midler slik som ustekinumab (en IL-12 og IL-23 blokker).