



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2445912 B1**

**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**C07D 471/04 (2006.01)**  
**A61K 31/437 (2006.01)**  
**A61P 29/00 (2006.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**  
**A61P 37/00 (2006.01)**

**Patentstyret**

---

|      |                                                                               |                                                                                                                                                                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Oversettelse publisert                                                        | 2014.12.29                                                                                                                                                                              |
| (80) | Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet | 2014.08.13                                                                                                                                                                              |
| (86) | Europeisk søknadsnr                                                           | 10728648.6                                                                                                                                                                              |
| (86) | Europeisk innleveringsdag                                                     | 2010.06.25                                                                                                                                                                              |
| (87) | Den europeiske søknadens Publiseringsdato                                     | 2012.05.02                                                                                                                                                                              |
| (30) | Prioritet                                                                     | 2009.06.26, US, 220685 P<br>2010.01.25, US, 298188 P                                                                                                                                    |
| (84) | Utpekte stater                                                                | AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB<br>GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO<br>PL PT RO SE SI SK SM TR                                                                    |
|      | Utpekte samarbeidende stater                                                  | BA ME RS                                                                                                                                                                                |
| (73) | Innehaver                                                                     | Galapagos N.V., Generaal de Wittelaan L11 A3, 2800 Mechelen, BE-Belgia                                                                                                                  |
| (72) | Oppfinner                                                                     | BLANC, Javier, Galapagos NVGeneraal De Wittelaan L11/A3, B-2800 Mechelen, BE-Belgia<br>MENET, Christel Jeanne Marie, Galapagos NVGeneraal de Wittelaan L11/A3, 2800 Mechelen, BE-Belgia |
| (74) | Fullmektig                                                                    | Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge                                                                                                                                 |

---

|      |                       |                                                                                               |
|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) | Benevnelse            | <b>Ny forbindelse anvendbar for behandlingen av degenerative og inflammatoriske sykdommer</b> |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO-A1-2008/025821<br>WO-A1-2009/017954<br>WO-A1-2010/010190                                   |

**Oppfinnelsens område**

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en forbindelse som er en inhibitor av JAK, en familie av tyrosinkinaser som er involvert i inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser, og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av denne forbindelse, farmasøytiske preparater som omfatter denne forbindelse og fremgangsmåter for å forebygge og/eller behandle inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6 ved administrering av en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Janus kinaser (JAK'er) er cytoplasmiske tyrosinkinaser som transduserer cytokinsignalling 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 betjener interferonene, mest interleukiner, så vel som en rekke cytokiner og endokrine faktorer slik som EPO, TPO, GH, SOM, LIF, CNTF, GM-CSF, og PRL (Vainchenker W. et al. (2008).

Kombinasjonen av genetiske modeller og småmolekyl JAK-inhibitor forskning viste det terapeutiske potensialet for en rekke JAK'er. JAK3 er validert ved mus og human 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/>).

TYK2 er et potensielt mål for immunoinflammatoriske 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 immunoinflammatoriske 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**

5 Degenereringen av brusk er et kjennetegn for forskjellige sykdommer blant hvilke 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  
10 tidlig død. Formålet med en RA-terapi er derfor ikke bare å moderere sykdommen, men også å oppnå remisjon for å stanse ledd-destruksjonen. Foruten alvorligheten av sykdomsutgangen, betyr den høye prevalens av RA (~0,8 % av voksne rammes verden over) en høy sosioøkonomisk innvirkning. (For omtaler av RA, refereres det til Smolen og Steiner (2003); Lee og Weinblatt (2001); Choy og Panayi (2001); O'Dell  
15 (2004) og Firestein (2003)).

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. For en omfattende oversikt over osteoartritt, vises det  
20 til Wieland et al., (2005).

Osteoartritt er vanskelig å behandle. Til nå er ingen kur tilgjengelig, og behandling fokuserer på lindring av smerte og på å forhindre at det rammede leddet blir deformert. Vanlig behandling inkluderer bruk av ikke-steroid antiinflammatoriske  
25 legemidler (NSAID'er). Skjønt kosttilskudd slik som chondroitin og glukosaminsulfat har fått støtte som sikre og effektive valg for behandling av osteoartritt, viste et nylig klinisk forsøk at begge behandlinger ikke reduserer smerte forbundet med osteoartritt. (Clegg et al., 2006). Sett under ett, er ingen sykdomsmodifiserende artrittlegemidler tilgjengelige.

30 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 utlødere kan stimulere anabolsk stimulering av chondrocytter.

35 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- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) familien kan indusere chondrocytt-anabol stimulering (Chubinskaya og Kuettner, 2003). En forbindelse er nylig blitt identifisert som induserer anabol stimulering av chondrocytter (US 6 500 854, EP 1 391 211). De fleste av disse forbindelser viser  
 5 imidlertid alvorlige bivirkninger, og der er følgelig et sterkt behov for forbindelser som stimulerer chondrocytt-differensiering uten disse bivirkninger.

Vendeghinste et al. (WO 2005/124342) oppdaget JAK1 som et mål hvis inhibering kan ha terapeutisk relevans for en rekke sykdommer som inkluderer OA. JAK1 tilhører  
 10 Janus kinase (JAK) familien av cytoplasmiske tyrosinkinaser involvert i cytokin-reseptormediert intracellulær signaltransduksjon. JAK-familien består av fire medlemmer: JAK1, JAK2, JAK3 og TYK2. JAK'er rekrutteres ved binding av cytokiner, etterfulgt av heterodimerisering av cytokinreseptoren, og en delt reseptorsubenhhet (vanlig gamma-c-kjede, gp130). JAK'er aktiveres deretter ved auto- og/eller  
 15 transfosforylering ved en annen JAK, som resulterer i fosforylering av reseptorene og rekruttering og fosforylering av medlemmer av signaltransduktoren og aktivatoren 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:  
 20 JAK1-/-mus døde innen 24 timer etter fødsel, og lymfocytutvikling var alvorlig svekket. Dessuten var JAK1-/-celler ikke, eller i mindre grad, 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).

25 Forskjellige grupper har involvert JAK-STAT-signalering i chondrocyttbiologi. Li et al. (2001) viste at onkostatins M induserer MMP- og TIMP3-geneekspressjon 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  
 30 involverer JAK-STAT-signalering. IL1-beta induserer bruskatabolisme ved å redusere ekspressjonen av matrikskomponenter, og ved å indusere ekspressjon 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 ekspressjon av NOS2 mRNA i chondrocytter, og at dette  
 35 var blokkert ved en JAK-inhibitor. Legendre et al. (2003) viste at IL6/IL6-reseptor induserte nedregulering av bruskspesifikk matriksgen kollagen II, aggrecan-kjerne og linkprotein i bovine artikulære chondrocytter, og at dette var mediert ved JAK/STAT-

signalering. Disse observasjoner foreslår derfor en rolle for JAK-kinaseaktivitet i bruskhomøostaser og terapeutiske muligheter for JAK-kinaseinhibitorer.

JAK-familiemedlemmer har vært implisert i ytterligere tilstander som inkluderer  
 5 myeloproliferative lidelser (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol. 44(10):2497-506),  
 hvor mutasjoner i JAK2 er blitt identifisert. Dette indikerer at inhibitoren av JAK,  
 særlig JAK2, også kan anvendes for behandling av myeloproliferative lidelser. I tillegg  
 er JAK-familien, særlig JAK1, JAK2 og JAK3, blitt forbundet med cancere, særlig  
 leukemier, f.eks. akutt myeloid leukemi (O'Sullivan et al., 2007, Mol Immunol.  
 10 44(10):2497-506; Xiang et al., 2008, "Identification of somatic JAK1 mutations in  
 patients with acute myeloid leukemia" Blood First Edition Paper, pre-publisert online  
 26. Desember 2007; DOI 10.1182/blood-2007-05-090308) og akutt lymfoblastisk  
 leukemi (Mullighan et al., 2009) eller faste tumorer f.eks. uterin leiomyosarkom  
 (Constantinescu et al., 2007, Trends in Biochemical Sciences 33(3): 122-131),  
 15 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  
 anvendes i behandling av cancer (leukemier og faste tumorer, f.eks. uterin  
 leiomyosarkom, prostatacancer).

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

En forbindelse med autoimmun sykdom er blitt etablert for JAK3 og Tyk2. Mutasjoner i  
 JAK3 men også i oppstrøms signaleringskomponentene gamma-c-reseptorkjede og  
 IL7-reseptor svarer samlet for ~ 70 % av tilfeller av human alvorlig kombinert  
 30 immunsvikt (O'Shea et al., 2004). Det skal bemerkes at JAK1 ko-opererer 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 immuninflammatoriske området.

35 WO 2009/017954 omhandler substituerte [1,2,4]triazol[1,5-a]pyridiner som JAK2-  
 inhibitorer.

De nåværende terapier er ikke tilfredsstillende, og der er derfor fremdeles et behov for å identifisere ytterligere forbindelser som kan anvendes for behandling av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser, og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor en forbindelse, fremgangsmåte for fremstilling derav, og farmasøytiske preparater som omfatter forbindelsen ifølge oppfinnelsen sammen med en passende farmasøytisk bærer. Forbindelsen utviser særlig høy potens og selektivitet for JAK1 i forhold til andre JAK-familiemedlemmer i tillegg til 385 kinase- og ikke-kinasemål. I tillegg indikerer data at forbindelsen har en god sikkerhetsmargin. Det er derfor konkludert med at den foreliggende oppfinnelse gir en ny mulighet for å behandle JAK1-medierte sykdommer, særlig inflammatoriske sykdommer slik som SLE (systemisk lupus erytematosus) og RA.

15

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også anvendelse av forbindelsen ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for behandling av disse sykdommer og tilstander.

20

### **Oppsummering av oppfinnelsen**

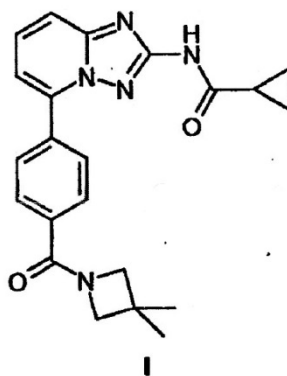
Den foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen at inhibitorer av JAK, særlig JAK1, er anvendbare for behandling av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse i brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser, og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av disse forbindelser, farmasøytiske preparater som omfatter disse forbindelser, og fremgangsmåter for å behandle inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6 ved administrering av forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

30

I et første aspekt av oppfinnelsen er en forbindelse ifølge oppfinnelsen vist med formel I:

35

6



Forbindelsen ifølge oppfinnelsen er en ny inhibitor av JAK som utviser en høy potens og selektivitet for JAK1 i forhold til andre JAK-familiemedlemmer og 385 kinase- og ikke-kinasemål, så vel som at den viser en god sikkerhetsmargin. Anvendelsen av en  
5 forbindelse med denne profil kan resultere i fordeler ved behandlingen av inflammatoriske sykdommer, særlig SLE og RA, som skyldes en lavere forekomst av ikke-mål effekter.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse farmasøytiske  
10 preparater som omfatter forbindelsen ifølge oppfinnelsen og en farmasøytisk bærer, eksipiens eller fortynningsmiddel. Dessuten er forbindelsen ifølge oppfinnelsen, anvendbar i de farmasøytiske preparater og behandlingsmetoder som omtalt her, farmasøytisk akseptert som fremstilt og anvendt. Ved dette aspekt av oppfinnelsen, kan det farmasøytiske preparat i tillegg omfatte ytterligere aktiv bestanddel som er  
15 egnet for anvendelse i kombinasjon med forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

I et ytterligere aspekt av oppfinnelsen tilveiebringer denne oppfinnelse en fremgangsmåte for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av en tilstand blant dem som er angitt her, særlig en slik tilstand som kan være  
20 forbundet med avvikende JAK-aktivitet, f.eks. inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser, og/eller sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, og som omfatter administrering av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen, eller ett eller flere  
25 av de farmasøytiske preparater beskrevet her. I et spesifikt aspekt, tilveiebringer denne oppfinnelse en fremgangsmåte for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av, en tilstand som kan være forbundet med avvikende JAK1-aktivitet, særlig inflammatoriske tilstander, proliferative sykdommer, og sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen 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 inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av bruskturnover, kongenitale brusk misdannelser og/eller sykdom forbundet med hypersekresjon av IL6. I et spesifikt aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandlingen eller forebygging av tilstander forbundet med avvikende JAK1-aktivitet, særlig inflammatoriske tilstander, proliferative sykdommer og sykdommer som involverer svekking av brusk-turnover.

I et ytterligere behandlingsmetodeaspekt, tilveiebringer denne oppfinnelse en fremgangsmåte for å behandle et pattedyr som er årsaksmessig 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 forbindelsen ifølge oppfinnelsen som beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform er den unormale JAK-aktivitet unormal JAK1-aktivitet.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling eller forebygging av en tilstand som er årsaksmessig relatert til unormal JAK-aktivitet. I en spesifikk utførelsesform er den unormale JAK-aktiviteten unormal JAK1-aktivitet.

I ytterligere aspekter tilveiebringer denne oppfinnelse fremgangsmåter for å syntetisere forbindelsen ifølge oppfinnelsen, hvor representative synteseprotokoller og syntesepor er omtalt senere her.

Det er følgelig et prinsipielt formål med denne oppfinnelse å tilveiebringe en forbindelse som kan modifisere aktiviteten av JAK, og således forhindre eller behandle en hvilken som helst tilstand som kan være årsaksmessig relatert dertil. Spesielt en hvilken som helst tilstand som kan være årsaksmessig relatert til aktiviteten av JAK1.

Det er et ytterligere formål med denne oppfinnelse å tilveiebringe en forbindelse som kan behandle eller lindre tilstander eller sykdommer eller symptomer på de samme, slik som inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av bruskturnover, kongenitale brusk misdannelser, og sykdommer forbundet med

hypersekresjon av IL6, som kan være årsaksmessig relatert til aktiviteten av JAK. Særlig sykdom eller tilstand som kan være årsaksmessig relatert til aktiviteten av JAK1.

- 5 Et enda ytterligere formål med denne oppfinnelse er å tilveiebringe farmasøytiske preparater som kan anvendes i en behandling eller forebygging av en rekke sykdomstilstander som inkluderer sykdommer forbundet med JAK-aktivitet, slik som inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantaavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, 10 kongenitale brusk misdannelser og sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6. Særlig tilstander forbundet med JAK1-aktivitet.

Andre formål og fordeler vil fremgå for den fagkyndige på området ut fra en vurdering av den etterfølgende detaljerte beskrivelse.

15

## **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

### **Definisjoner**

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

- 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 25 etterfølgende betydninger dersom annet ikke er indikert.

- Artiklene "en/ei/et" kan anvendes her for å referere til én eller flere enn én (dvs. minst én) av artikkelens grammatikalske objekter. Som et eksempel betyr "en analog" 30 én analog, eller mer enn én analog.

30

- "Farmasøytisk akseptert" betyr godkjent eller som kan godkjennes av en regulerende myndighet innen forbundsstaten, eller av et offentlig styre eller tilsvarende myndighet i et land annet enn USA, eller som listet opp i the U.S. Pharmacopoeia eller annen generelt anerkjent farmakopeia for anvendelse i dyr, og 35 mer spesielt i mennesker.

"Farmasøytisk aksepterbart salt" refererer til et salt for forbindelsen 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.

5 Spesifikt inkluderer slike salter: (1) syreaddisjonssalter dannet fra uorganiske syrer slik som saltsyre, hydrobromsyre, svovelsyre, salpetersyre, fosforsyre og liknende; eller dannet med organiske syrer slik som eddiksyre, propionsyre, heksansyre, syklopentanpropionsyre, glykolsyre, druesyre, melkesyre, malonsyre, ravsyre, eplesyre, maleinsyre, ravsyre, vinsyre, sitronsyre, benzoesyre, 3-(4-

10 hydroksybenzoyl)benzoesyre, kanelisyre, mandelsyre, metansulfonsyre, etansulfonsyre, 1,2-etan-disulfonsyre, 2-hydroksyetansulfonsyre, benzensulfonsyre, 4-klorbenzensulfonsyre, 2-naftalensulfonsyre, 4-toluensulfonsyre, kamfersulfonsyre, 4-metylbisoksyklo[2.2.2]-okt-2-en-1-karboksylysyre, glukohexonsyre, 3-fenylpropionsyre, trimetyleddiksyre, tertiær butyleddiksyre, laurylsvovelsyre, glukonsyre, glutamsyre,

15 hydroksynaftosyre, salisylysyre, stearinsyre, mukonsyre, og liknende; eller (2) salter dannet når et surt proton er tilstede i moderforbindelsen, enten erstattet med et 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. Ytterligere salter inkluderer, men kun som et eksempel,

20 natrium, kalium, kalsium, magnesium, ammonium, tetraalkylammonium, og liknende; og når forbindelsen inneholder en basisfunksjonalitet, salter av ikke-toksiske 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

25 kationer er eksemplifisert ved natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium-, ammonium-, tetraalkylammoniumkationer og liknende.

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

30

"Solvat" refererer til former av forbindelsen 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

35 kan solvatiseres eller hydratiseres. Passende solvater inkluderer farmasøytisk aksepterbare solvater slik som hydrater, og inkluderer ytterligere både støkiometriske solvater og ikke-støkiometriske solvater. I bestemte tilfeller vil solvat 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.

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

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

"Forebygge" eller "forebygging" refererer til en reduksjon i risiko for å få eller utvikle  
15 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 pre-disponert for sykdommen før sykdomsutbrudd).

Betegnelsen "profylakse" er relatert til "forebygging", og refererer til et mål eller en  
20 prosedyre for det formål å forebygge heller enn å behandle eller helbrede en sykdom. Ikke-begrensede eksempler på profylaktiske mål kan inkludere administrering av vaksiner, administreringen av heparin med lav molekylvekt til hospitaliserte pasienter med risiko for trombose som f.eks. skyldes immobilisering, og administrering av et anti-malariamiddel slik som klorokin før besøk til et geografisk område hvor malaria er  
25 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 en utførelsesform, til å forbedre sykdommen eller lidelsen (dvs. stanse sykdommen eller redusere manifestasjonen, omfanget eller alvorligheten av minst ett av de  
30 kliniske symptomene derpå). I en annen utførelsesform refererer "behandle" eller "behandling" til å forbedre minst en fysisk parameter som eventuelt ikke er oppdaget i individet. I en ytterligere utførelsesform refererer "behandle" eller "behandling" til modulering av sykdommen eller lidelsen, enten fysisk (f.eks. stabilisering av et merkbart symptom), fysiologisk (f.eks. stabilisering av en fysisk parameter), eller  
35 begge. I en ytterligere utførelsesform relaterer "behandle" eller "behandling" til å nedsette sykdomsprogresjonen.

- Som anvendt her refererer betegnelsen "inflammatorisk tilstand(er)" til gruppen av tilstander som inkluderer reumatoid artritt, osteoartritt, juvenil idiopatisk artritt, psoriasis, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma, rinitt), inflammatorisk tarmsykdom (f.eks. Crohns sykdom, kolitt), endotoksindrevne sykdomstilstander (f.eks. komplikasjoner etter bypasskirurgi eller kroniske endotoksintilstander som bidrar til f.eks. kronisk hjertesvikt), og relaterte sykdommer som involverer brusk, slik som brusk i leddene. Betegnelsen refererer særlig til reumatoid artritt, osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og inflammatoriske tarmsykdommer.
- Som anvendt her refererer "autoimmun sykdom(mer)" 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 inveterat astma (f.eks. sen astma og luftveis-hyperfølsomhet), bronkitt som inkluderer bronkial astma, systemisk lupus erytematosus (SLE), multippel sklerose, type I diabetes mellitus og komplikasjoner forbundet dermed, atopisk eksem (atopisk dermatitt), kontaktdermatitt, og ytterligere eksematøs dermatitt, inflammatorisk tarmsykdom (f.eks. Crohns sykdom og ulcerøs kolitt), aterosklerose og amyotrof lateralsklerose. Betegnelsen refererer særlig til COPD, astma, systemisk lupus erytematosus, type I diabetes mellitus og inflammatorisk tarmsykdom.
- Som anvendt her refererer betegnelsen "proliferativ sykdom(mer)" til tilstander slik som cancer (f.eks. uterin leiomyosarkom eller prostatacancer), myeloproliferative lidelser (f.eks. polycytemia vera, essensiell trombocytose og myelofibrose), leukemi (f.eks. akutt myeloid leukemi og akutt lymfoblastisk leukemi), multippel myelom, psoriasis, restenose, sklerodermitt eller fibrose. Betegnelsen refererer særlig til cancer, leukemi, multippel myelom og psoriasis.
- Som anvendt her refererer betegnelsen "cancer" til en malign eller benign vekst av celler i huden eller i kroppsorganer, f.eks. men uten begrensning, bryst, prostata, lunge, nyre, pankreas, mage eller tarm. En cancer har en tendens til å infiltrere inn i nærliggende ve, og spre seg (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, rhabdomyosarkom og mastocytom, og typer av vevskarsinom slik som, men ikke begrenset til, kolorektal cancer, prostatacancer, småcellet luncancer og ikke-småcellet luncancer, brystcancer, pankreascancer,

blærecancer, renal cancer, gastrisk cancer, glioblastom, primær levercancer, ovariecancer, prostatacancer og uterin leiomyosarkom.

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

10 Som anvendt her inkluderer betegnelsen "transplantatavstøtning" til den akutte eller kroniske avstøtning av celler, vev eller fast organ allo- eller xenografter 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.

15 Som anvendt her inkluderer betegnelsen "sykdom som involverer svekking av bruskturnover" tilstander slik som osteoartritt, psoriastisk artritt, juvenil reumatoid artritt, podagraartritt, septisk eller infeksøs artritt, reaktiv artritt, reflekssympatetisk dystrofi, algodystrofi, Tietze syndrom, eller kostal chondritt, fibromyalgi, osteochondritt, 20 nevrogen eller nevropatisk artritt, artopati, endemiske former av artrittliknende osteoarthritis deformans endemica, Mseleni sykdom og Handigodu sykdom; degenerering resulterende fra fibromyalgi, systemisk lupus erytematosus, skleroderma og ankyloserende spondylitt.

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

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

35 Som anvendt her relaterer betegnelsen "JAK" til familien av Janus kinaser (JAK'er) som er cytoplasmiske tyrosinkinaser som transduserer cytokinsignalering fra membranreseptorer til STAT-transkripsjonsfaktorer. Fire JAK-familiemedlemmer er beskrevet, JAK1, JAK2, JAK3 og TYK2, og betegnelsen JAK kan referere til alle JAK-

familiemedlemmene samlet, eller til én eller flere av JAK-familiemedlemmene, alt ettersom sammenhengen tillater.

5 "Forbindelse(r) ifølge oppfinnelsen" og ekvivalente uttrykk er ment til å omfatte forbindelsene med formelen som beskrevet her, og uttrykket inkluderer de farmasøytisk aksepterbare salter og solvater, f.eks. hydrater, og solvatene av de farmasøytisk aksepterbare salter der hvor sammenhengen tillater dette. Likeledes skal referanse til mellomprodukter, enten de er patentsøkt eller ikke, ment til å omfatte deres salter og solvater, hvor sammenhengen tillater dette.

10

Når områder er omtalt her, f.eks., men uten begrensning, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl, bør angivelsen av et område betraktes til å representere hvert medlem av nevnte område.

15

Som anvendt her refererer betegnelsen "isotop variant" til en forbindelse som inneholder unaturlig andel av isotoper av 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 (<sup>2</sup>H eller D), karbon-13 (<sup>13</sup>C), nitrogen-15 (<sup>15</sup>N), eller liknende. Det vil forstås at, i en forbindelse hvor en slik isotop substitusjon gjennomføres, kan de etterfølgende atomer, hvor tilstede, variere, slik at 20 f.eks. et hvilket som helst hydrogen kan være <sup>2</sup>H/D, et hvilket som helst karbon kan være <sup>13</sup>C, eller et hvilket som helst nitrogen kan være <sup>15</sup>N, og at tilstedeværelsen og plasseringen av slike atomer kan bestemmes innenfor fagkunnskapen på området. Likeledes kan oppfinnelsen inkludere fremstilling av isotopvarianter med radioisotoper i f.eks. det tilfellet hvor de resulterende forbindelser kan anvendes for legemiddel 25 og/eller substrat-vevsfordelingsstudier. De radioaktive isotopene tritium, dvs. <sup>3</sup>H og karbon-14, dvs. <sup>14</sup>C, er særlig anvendbare for dette formål på grunn av at de er enkle å innlemme og er tilgjengelige midler for deteksjon. Ytterligere forbindelser kan fremstilles som er substituert med positronemitterende isotoper, slik som <sup>11</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O og <sup>13</sup>N, og vil være anvendbare i "Positron Emission Topography" (PET) studier for å 30 undersøke substratreseptorokkupasjon.

Alle isotopvarianter av forbindelsen tilveiebrakt her, som er radioaktive eller ikke, skal være omfattet av oppfinnelsens ramme.

35

Stereoisomerer som ikke er speilbilder av hverandre betegnes "diastereomerer", og de som er speilbilder som ikke kan legges oppå hverandre betegnes "enantiomerer". Når en forbindelse har et asymmetrisk senter, den er f.eks. bundet til fire forskjellige

grupper, er et par av enantiomerer mulig. En enantiomer kan være kjennetegnet ved den absolutte konfigurasjon av 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 betegnet som høyredreie eller venstredreie (dvs. 5 som henholdsvis (+) eller (-) isomerer). En kiral forbindelse kan eksistere som enten individuell enantiomer, eller som en blanding derav. En blanding som inneholder like andeler av enantiomerene betegnes en "rasemisk blanding".

"Tautomerer" refererer til forbindelser som er byttbare former av en spesiell 10 forbindelsesstruktur, og som kan variere ved erstatningen av hydrogenatomer og elektroner. To strukturer kan således være i likevekt gjennom bevegelsen av  $\pi$  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 nitroformer av fenylnitrometan, som likeledes dannes ved 15 behandling med syre eller base.

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

20 Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan ha ett eller flere asymmetriske sentre, og slike forbindelser kan derfor fremstilles som individuelle (R)- eller (S)-stereoisomerer, eller som en blanding derav.

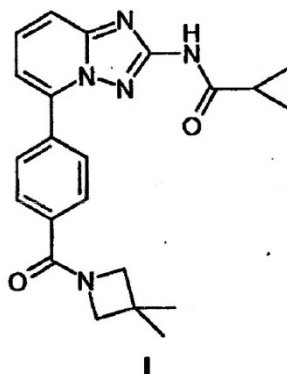
Dersom annet ikke er indikert, skal beskrivelsen eller navngiving av en spesiell 25 forbindelse i beskrivelsen og kravene inkludere både individuelle enantiomerer og blandinger, racemiske eller på annen måte derav. Fremgangsmåtene for å bestemme stereokjemi og separasjonen av stereoisomerer, er vel kjent innen teknikkens stand.

### **Forbindelsen**

30 Den foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen at inhibitorer av JAK er anvendbare for behandling av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale brusk misdannelser, og sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer 35 også fremgangsmåter for fremstilling av forbindelsen, farmasøytiske preparater som omfatter forbindelsen, og fremgangsmåter for å behandle sykdommer som involverer bruskdegradering, ben- og/eller ledd-degradering og/eller inflammasjon ved

administrering av forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Den foreliggende oppfinnelse er en inhibitor av medlemmer av JAK-familien, den inhiberer spesifikt aktiviteten til JAK1, JAK2, JAK3 og TYK2. Den inhiberer særlig aktiviteten til JAK1.

- 5 I et første aspekt av den foreliggende oppfinnelse, er det følgelig tilveiebrakt en forbindelse ifølge oppfinnelsen med formel I:



- 10 Forbindelsen ifølge oppfinnelsen er syklopropankarboksylsyre {5-[4-(3,3-dimetyl-azetidin-1-karbonyl)-fenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid.

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

- 15 I ett aspekt er forbindelsen ifølge oppfinnelsen tilstede som den frie base.

I ett aspekt er forbindelsen ifølge oppfinnelsen et farmasøytisk aksepterbart salt.

I ett aspekt er forbindelsen ifølge oppfinnelsen et solvat av forbindelsen.

20

I ett aspekt er forbindelsen ifølge oppfinnelsen et solvat av et farmasøytisk aksepterbart salt av forbindelsen.

### **Farmasøytiske preparater**

- 25 Når anvendt som et farmasøytikum, administreres forbindelsen 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 forbindelsen ifølge oppfinnelsen i en farmasøytisk effektiv mengde. Mengden av forbindelsen som i realiteten administreres vil typisk
- 30 bestemmes av en lege, sett på bakgrunn av de relevante forhold som inkluderer

tilstander som skal behandles. Den valgte administreringsrute, den aktuelle forbindelsen som administreres, alder, vekt og respons hos den individuelle pasienten, alvorligheten av pasientens symptomer og liknende.

5 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 avleveringsrute, er forbindelsen ifølge oppfinnelsen foretrukket formulert som enten injiserbare eller orale preparater, eller som salver, lotioner, eller som plastre, alle for transdermal  
10 administrering.

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

25 Flytende former som er 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 en hvilken som helst av de etterfølgende forbindelser av en tilsvarende natur: et bindemiddel slik som mikrokrySTALLinsk cellulose, tragakantgummi eller  
30 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, etylsalisylat eller appelsinsmak.

35 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.

5 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  
10 bestanddeler typisk kombineres med enten 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 vel kjent innen teknikken, og inkluderer generelt ytterligere bestanddeler for å øke hudpenetreringsstabiliteten til de aktive bestanddeler eller formuleringer. Alle slike kjente transdermale  
15 formuleringer og bestanddeler er inkludert innenfor rammen av denne oppfinnelse.

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

De ovenfor beskrevne 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 til Remington's Pharmaceutical  
25 Sciences, 17. utgave, 1985, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, som er innlemmet heri ved referanse.

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan også administreres i former med forsinket frigivelse, eller fra legemiddelavleveringssystemer med forsinket frigivelse. En  
30 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  
35 foreliggende oppfinnelse er imidlertid ikke begrenset til de etterfølgende farmasøytiske preparater.

**Formulering 1 – tabletter**

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan blandes som et tørt pulver med et tørt gelatinbindemiddel i et omtrentlig 1:2 vektforhold. En mindre mengde magnesiumstearat kan tilsettes som et smøremiddel. Blandingen kan dannes til 240-  
5 270 mg tabletter (80-90 mg av aktiv amidforbindelse pr. tablett) i en tablettpresse.

**Formulering 2 – kapsler**

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

**Formulering 3 – væske**

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen (125 mg) kan blandes med sukrose (1,75 g) og xantangummi (4 mg), og den resulterende blanding kan blandes, føres gjennom en  
15 nr. 10 mesh U.S. sikt, og deretter blandes med en på forhånd dannet oppløsning av mikrokrySTALLinsk cellulose og natriumkarboksymetylcellulose (11:89, 50 mg) i vann. Natriumbenzoat (10 mg), smaksstoffer og farge kan fortynnes med vann og tilsettes med omrøring. Tilstrekkelig vann kan deretter tilsettes ved omrøring. Tilstrekkelig vann kan deretter tilsettes for å fremstille et totalt volum på 5 mL.

20

**Formulering 4 – tabletter**

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan blandes som et tørt pulver med et tørt gelatinbindemiddel i et omtrentlig 1:2 vektforhold. Magnesiumstearat kan tilsettes som et smøremiddel. Blandingen dannes til 450-900 mg tabletter (150-300 mg av  
25 aktiv amidforbindelse) i en tablettpresse.

**Formulering 5 – injeksjon**

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan oppløses eller suspenderes i et injiserbart vandig medium og bufret sterilt saltvann til en konsentrasjon på omtrent 5 mg/mL.

30

**Formulering 6 – topisk**

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

**Metoder for behandling**

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan anvendes som et terapeutisk middel for behandling av tilstander i pattedyr som er årsaksmessig relatert til, eller skyldes avvikende JAK-aktivitet. Spesielt tilstander som relatert til avvikene i JAK1-aktivitet.

5 Forbindelsen og de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan således anvendes som terapeutika for å forebygge og/eller behandle inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenital brusk misdannelse, og sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6 i pattedyr  
10 som inkluderer mennesker.

I ytterligere aspekter av behandlingsmetoder tilveiebringer denne oppfinnelsen metoder for å behandle pattedyr som er tilbøyelig til, eller som er rammet av en inflammatorisk tilstand. Metodene omfatter administrering av en effektiv  
15 tilstandsbehandling eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen som beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform er den inflammatoriske tilstand valgt fra reumatoid artritt, osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og inflammatoriske tarmsykdommer.

20

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av en inflammatorisk tilstand. I en spesifikk utførelsesform er den inflammatoriske tilstand valgt fra reumatoid artritt, osteoartritt, allergisk luftveissykdom (f.eks. astma) og  
25 inflammatoriske tarmsykdommer.

I et ytterligere aspekt av behandlingsmetoder tilveiebringer denne oppfinnelsen metoder for å behandle et pattedyr som er tilbøyelig til, eller som er rammet av, en autoimmun sykdom. Metoden omfatter administrering av en effektiv  
30 tilstandsbehandling eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsene 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.

35

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av 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.

5 I et ytterligere aspekt av behandlingsmetoder, tilveiebringer denne oppfinnelse metoder for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av, en proliferativ sykdom, særlig cancer (særlig faste tumorer slik som uterin leiomyosarkom eller prostatacancer), leukemi (f.eks. AML eller ALL), multippel myelom og/eller psoriasis. Metodene omfatter administrering av en effektiv  
10 tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsen ifølge oppfinnelsen som beskrevet her.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av en  
15 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.

I et ytterligere aspekt av behandlingsmetoder tilveiebringer denne oppfinnelse metoder for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av, transplantatavstøtning. Metodene omfatter administrering av en effektiv  
20 tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen som beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen metoder for å behandle  
25 organtransplantatavstøtning.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av transplantatavstøtning. I en spesifikk utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen metoder for å behandle  
30 organtransplantatavstøtning.

I ett aspekt av behandlingsmetodene tilveiebringer denne oppfinnelse en metode for å behandle, forebygge eller for profylakse i et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover. Metodene  
35 omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsen ifølge oppfinnelsen som beskrevet her.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av sykdommer som inkluderer svekkelse av brusk-turnover.

5

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en metode for å behandle kongenitale bruskmisdannelser. Metoden omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsen ifølge oppfinnelsen beskrevet her.

10

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av kongenitale bruskmisdannelser.

15

I et ytterligere aspekt av behandlingsmetoder tilveiebringer denne forbindelse metoder for å behandle et pattedyr som er mottakelig for, eller som er rammet av, sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, særlig Castlemans sykdom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt. Metodene omfatter administrering av en effektiv tilstandsbehandlende eller tilstandsforebyggende mengde av ett eller flere av de farmasøytiske preparater eller forbindelsene ifølge oppfinnelsen som beskrevet her.

20

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av sykdommer forbundet med hypersekresjon av IL6, særlig Castlemans sykdom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.

25

Som et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er der tilveiebrakt forbindelsen ifølge oppfinnelsen for anvendelse som et farmasøytikum, særlig for behandling eller forebygging av de ovennevnte tilstander eller sykdommer. Også tilveiebrakt her er anvendelsen av forbindelsen for fremstilling av et medikament for behandling eller forebygging av én av de overnevnte tilstander eller sykdommer.

30

Et særlig regime av den foreliggende metode omfatter administrering, til et individ som lider av en inflammatorisk tilstand, av en effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å redusere inflammasjonsnivået i individet, og foretrukket terminere prosesser som er ansvarlige for nevnte inflammasjon. En spesifikk utførelsesform av metoden omfatter administrering av en

35

effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen til et individ som lider av, eller som er mottakelig for utvikling av, reumatoid artritt i en tidsperiode for å redusere eller henholdsvis forhindre inflammasjon i ledd hos nevnte pasient, og foretrukket terminere prosessen ansvarlig for nevnte inflammasjon.

5

Et ytterligere særlig regime ifølge den foreliggende metode omfatter administrering, til et individ som lider av sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, f.eks. osteoartritt, av en effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å redusere og foretrukket terminere de selvfortsettende prosesser som er ansvarlig for nevnte degradering. En særlig utførelsesform av metoden omfatter administrering av en effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen til en pasient som lider av eller som er mottakelig for utvikling av osteoartritt, i en tidsperiode som er tilstrekkelig til å redusere eller henholdsvis forhindre bruskdegradering i ledd hos nevnte pasient, og foretrukket terminere de selvfortsettende prosesser som er ansvarlig for nevnte degradering. I en særlig utførelsesform kan nevnte forbindelse utvise bruskanabole og/eller antikatabole egenskaper.

20

Injeksjonsdosenivåer varierer fra omtrent 0,1 mg/kg/time til minst 10 mg/kg/time, alle fra omtrent 1 til omtrent 120 timer og særlig 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. Maksimal total dose forventes ikke å overskride omtrent 2 g/dag i en 40 til 80 kg menneskepasient.

25

30

For å forebygge og/eller behandle langtidstilstander slik som degenerative tilstander, strekker behandlingsregimet seg vanligvis over mange måneder eller år, slik at oral dosering er foretrukket for pasienten av bekvemmelighetshensyn og toleranse. Med oral dosering er fra 1 til 5, og særlig 2 til 4, og typisk 3 orale doser pr. dag representative regimer. Ved å anvende disse dosemonstre, tilveiebringer hver dose fra omtrent 0,01 til omtrent 20 mg/kg av forbindelsen ifølge oppfinnelsen, hvor spesielle doser hver tilveiebringer fra omtrent 0,1 til omtrent 10 mg/kg, og særlig omtrent 1 til omtrent 5 mg/kg.

35

Transdermale doser velges generelt for å tilveiebringe tilsvarende eller lavere blodnivåer enn oppnådd ved å anvende injeksjonsdoser.

Når anvendt for å forebygge utbrudd av en inflammatorisk tilstand, vil forbindelsen ifølge oppfinnelsen administreres til en pasient med risiko for å utvikle tilstanden, typisk ifølge råd og under tilsyn av en lege, ved doseringsnivåene som beskrevet ovenfor. Pasienter med risiko for å utvikle en spesiell tilstand, inkluderer spesielt dem som har en familiær historie i forbindelse med tilstanden, eller dem som er blitt identifisert ved gentesting eller screening til å være særlig mottakelige for å utvikle tilstanden.

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan administreres som det eneste aktive middel, eller kan administreres i kombinasjon med andre midler som inkluderer andre forbindelser som viser samme eller tilsvarende terapeutisk aktivitet, og 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, for dermed å redusere risikoen for bivirkninger.

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

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 som ikke er begrenset til, analgesiske midler, ikke-steroide antiinflammatoriske midler (NSAID'er), steroider, syntetiske DMARD'er (f.eks., men uten begrensning, metotreksat, lefunomid, sulfasalazin, auranofin, natriumaurotiomalat, penicillamin, klorokin, hydroksyklorokin, azatioprin og syklosporin), og biologiske DMARD'er (f.eks., men uten 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, særlig midler som inkluderer, men som ikke er begrenset til: metotreksat, leukovorin, adriamycin, prenison, bleomycin, syklofosamid, 5-fluoruracil, paklitaksel, docetaksel, vinkristin, vinblastin, vinorelbin, doksorubicin, tamoksifen, toremifen, megestrolacetat,

anastrozol, goserelin, anti-HER2 monoklonalt antistoff (f.eks. Herceptin™), kapecitabin, raloksifenhydroklorid, EGFR-inhibitorer (f.eks. Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), VEGF-inhibitorer (f.eks. Avastatin™), proteasominhibitorer (f.eks. Velcade™), Glivec® og hsp90-inhibitorer (f.eks. 17-AAG). I tillegg kan forbindelsen 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 lidelse valgt fra cancer, myeloproliferativ sykdom eller leukemi.

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av autoimmune sykdommer; særlige midler inkluderer, men er ikke begrenset til, glukokortikoider, cytostatiske midler (f.eks. purinanaloger), alkyleringsmidler (f.eks. nitrogensennepegassderivater (syklofosfamid), nitrosoareforbindelser, platinaforbindelser, og andre), 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, Atgam® og Thymoglobiline®), syklosporin, takrolimus, ramamycin (sirolimus), interferoner (f.eks. IFN-β), TNF-bindingsproteiner (f.eks. infliksimab (Remicade™), etanercept (Enbrel™), eller adalimumab (Humira™)), mykoefnolat, fingolimod og myriocin.

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av transplantatavstøtning og særlige midler inkluderer, men er ikke begrenset til: kalsineurininhibitorer (f.eks. syklosporin 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-2Rα-reseptorantistoffer, basiliksimab, daklizumab), polyklonale anti-T-celle antistoffer (f.eks. anti-tymocytglobulin (ATG), anti-lymfocytglobulin (ALG)).

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av astma og/eller rhinitt og/eller COPD, og særlige midler inkluderer, men er ikke begrenset til: beta<sub>2</sub>-adrenoceptoragonister (f.eks. salbutamol, levalbuterol, terbutalin og bitolterol), epinefrin (inhalert eller tablett), anticholinerge midler (f.eks. ipratropiumbromid), glukokortikoider (oral eller inhalert), lengevirkende β<sub>2</sub>-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. montelukast, zafirlukast og zileuton), inhibitorer av mediatorfrigivelse (f.eks. kromglykat og ketotifen), biologiske regulatorer av IgE-respons (f.eks. omalizumab),  
 5 antihistaminer (f.eks. ceterizin, cinnarizin, feksofenadin), og vasokonstriktorer (f.eks. oksymetazolin, xylometazolin, nafazolin og tramazolin).

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

I én utførelsesform blir forbindelsen ifølge oppfinnelsen ko-administrert med et annet  
 20 terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av irritabel tarmsykdom (IBD), og særlig midler inkluderer, men er ikke begrenset til: glukokortikoider (f.eks. prednison, budesonid), syntetiske sykdomsmodifiserende immunomodulerende midler (f.eks. metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, mesalazin, azatioprin, 6-merkaptopurin, og siklosporin) og biologiske sykdomsmodifiserende immunomodulerende midler  
 25 (infliksimab, adalimumab, rituksimab og abatacept).

I én utførelsesform ko-administreres forbindelsen ifølge oppfinnelsen med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av systemisk lupus erytematosus og særlige midler inkluderer, men er ikke begrenset til:  
 30 sykdomsmodifiserende antireumatiske legemidler (DMARD'er) slik som antimalariamidler (f.eks. plaquenil, hydroksyklorokin), immunosuppressjonsmidler (f.eks. metotreksat og azatioprin), syklofosfamid og mykofenolsyre; immunsuppressjonslegemidler og analgesiske midler, slik som ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler, opiater (f.eks. dekstropropoksyfen og ko-kodamol),  
 35 opioider (f.eks. hydrokodon, oksykodon, MS Contin eller metadon) og 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, og spesielle midler inkluderer, men er ikke begrenset til: topiske behandlinger slik som badoppløsninger, fuktighetsbevarende midler, medisinerter kremer og salver som inneholder kulltjære, 5 ditranol (antralin), kortikosteroider slik som desoksimetason (Topicort™), fluocinonid, vitamin D<sub>3</sub>-analoger (f.eks. kalsipotriol), argonolje og retinoider (etretinat, acitretin, tazaroten), systemiske behandlinger slik som metotreksat, syklosporin, retinoider, tioguanin, hydroksyurea, sulfasalazin, mykofenolat mofetil, azatioprin, takrolimus, fumarsyreestere eller biologiske midler slik som Amevive™, Enbrel™, Humira™, 10 Remicade™, Raptiva™ og ustekinumab (en IL-12- og IL-13-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)).
- 15 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 vesentlig. Midlene kan administreres i forskjellige formuleringer og på forskjellige 20 tidspunkter.

## **Generelle synteseprosedyrer**

### **Generelt**

- Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan fremstilles fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av de etterfølgende generelle metoder og prosedyrer. Det vil forstås 25 at der hvor typiske foretrukne fremgangsmåtebetingelser (dvs. reaksjons-temperaturer, tid, 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 30 løsningsmiddel 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 35 uønskede reaksjoner. Valget 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 angitt mer detaljert med hensyn til fremstillingen av forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan fremstilles fra kjente eller kommersielt tilgjengelige utgangsmaterialer og reagenser av en fagkyndig på området innen organisk syntese.

Alle reagenser var 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 inert atmosfære. Løsningsmidlet med reagenskvalitet ble anvendt i alle andre tilfeller dersom annet ikke er spesifikt angitt. Kolonnekromatografi ble gjennomført på silikagel 60 (35-70  $\mu\text{m}$ ). Tynnsjikt-kromatografi ble gjennomført ved å anvende forbelagte silikagel F-254-plater (tykkelse 0,25 mm).  $^1\text{H}$  NMR spektra ble registrert på et Bruker DPX 400 NMR spektrometer (400 MHz). Kjemiske skift ( $\delta$ ) for  $^1\text{H}$  NMR spektra er angitt i deler pr. million (ppm) i forhold til tetrametylsilan ( $\delta$  0,00), eller passende restløsningsmiddeltopp, dvs.  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta$  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 plattform LC/MS-spektrometer. Kolonner anvendt for alle LCMS-analyser: Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm, ID x 50 m L (Part No. 186002350)). Preparativ HPLC: Waters XBridge Prep C18 5  $\mu\text{m}$  ODB 19 mm ID x 100 mm L (Part No. 186002978). Alle metodene anvender MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$ -gradienter.  $\text{H}_2\text{O}$  inneholder enten 0,1 % TFA eller 0,1 %  $\text{NH}_3$ .

Det følgende er en liste over forkortelser som anvendt i den eksperimentelle delen:

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| DCM   | Diklormetan                |
| DiPEA | N,N-diisopropyletylamin    |
| MeCN  | Acetonitril                |
| BOC   | tert-butyloksykarbonyl     |
| MF    | N,N-dimetylformamid        |
| Kat.  | Katalytisk mengde          |
| TFA   | Trifluoreddiksyre          |
| THF   | Tetrahydrofuran            |
| NMR   | Nukleær magnetisk resonans |

|                        |                                                                                                                                                                     |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DMSO                   | Dimetylsulfoksid                                                                                                                                                    |
| LC-MS                  | Væskekromatografi-massespektrometri                                                                                                                                 |
| Ppm                    | Deler pr. million                                                                                                                                                   |
| Pd/C                   | Palladium på trekull 10 %                                                                                                                                           |
| PMB                    | Para-metoksybenzyl                                                                                                                                                  |
| PyBOP                  | Benzotriazol-1-yl-oksy-tris-pyrrolidino-fosfoniumheksafluorborat                                                                                                    |
| EtOAc                  | Etylacetat                                                                                                                                                          |
| APCI                   | Atmosfæretrykk kjemisk ionisering                                                                                                                                   |
| Rt                     | Retensjonstid                                                                                                                                                       |
| s                      | Singlett                                                                                                                                                            |
| br s                   | Bred singlett                                                                                                                                                       |
| m                      | Multiplett                                                                                                                                                          |
| min                    | Minutt                                                                                                                                                              |
| mL                     | Milliliter                                                                                                                                                          |
| µL                     | Mikroliter                                                                                                                                                          |
| g                      | Gram                                                                                                                                                                |
| mg                     | Milligram                                                                                                                                                           |
| PdCl <sub>2</sub> dppf | [1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocen]diklorpalladium(II)                                                                                                               |
| TEA                    | Trietylamin                                                                                                                                                         |
| MMP                    | Matriksmetallproteinase                                                                                                                                             |
| NHAC                   | Normale humane artikulære chondrocytter                                                                                                                             |
| shRNA                  | Kort hårnål-RNA                                                                                                                                                     |
| RNA                    | Ribonukleinsyre                                                                                                                                                     |
| Ad-Si RNA              | Adenoviral kodet siRNA                                                                                                                                              |
| PBST                   | Fosfatbufret saltvann med Tween 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4 |
| APMA                   | 4-aminofenylkvikksølvacetat                                                                                                                                         |
| DMEM                   | Dulbeccos modifiserte Eagle medium                                                                                                                                  |
| FBS                    | Føtalt bovint serum                                                                                                                                                 |
| hCAR                   | Human cellulær adenovirusreseptor                                                                                                                                   |
| 3-MOI                  | Infeksjonsmultiplisitet på 3                                                                                                                                        |
| dNTP                   | Deoksyribonukleosidtrifosfat                                                                                                                                        |
| QPCR                   | Kvantitativ polymerasekjedereaksjon                                                                                                                                 |
| cDNA                   | Kopi-deoksyribonukleinsyre                                                                                                                                          |
| GAPDH                  | Glyseraldehydfosfatdehydrogenase                                                                                                                                    |

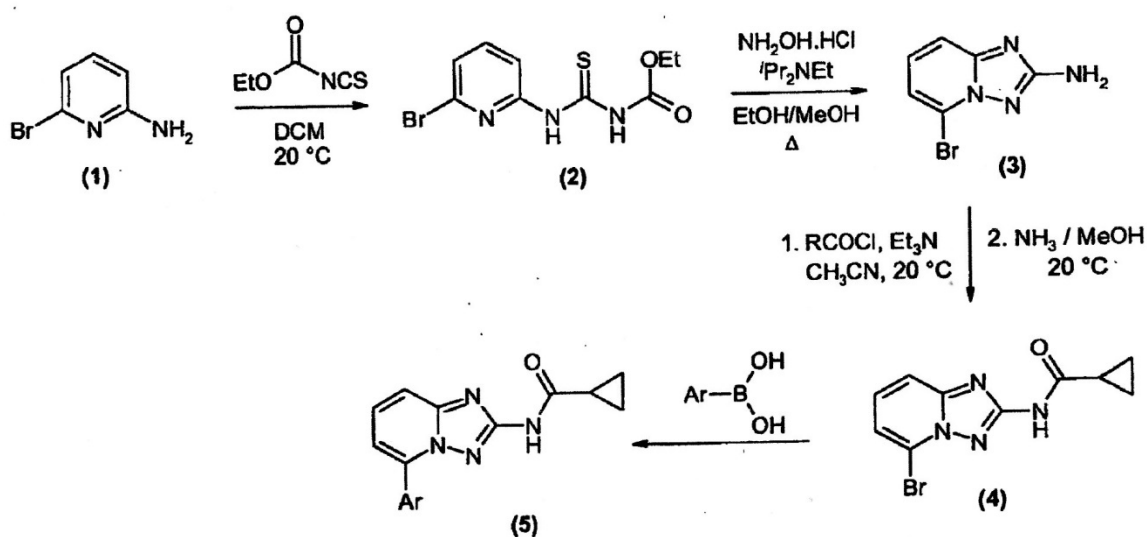
## Syntesefremstilling av forbindelsen ifølge oppfinnelsen

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan fremstilles i henhold til det etterfølgende skjema.

5

### Generell syntesemetode

#### Skjema I



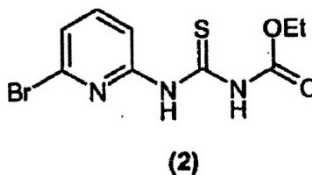
10

hvor Ar representerer 4-(3,3-dimetyl-azetidin-1-karbonyl)-fenyl.

### Generelt

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

15

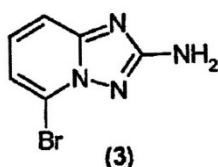


20

Til en oppløsning av 2-amino-6-brompyridin (1) (253,8 g, 1,467 mol) i DCM (2,5 L) avkjølt til 5°C ble det tilsatt etoksykarbonylisotiocyanat (173,0 mL, 1,467 mol) dråpevis over 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter tillatt oppvarmet til romtemperatur (20°C) og ble omrørt i 16 timer. Avdamping i vakuum gir et faststoff som kan samles ved filtrering, vaskes inngående med petrol (3 x 600 mL) og lufttørkes til å gi (2). Tioureaet kan anvendes som sådan for det neste trinn uten

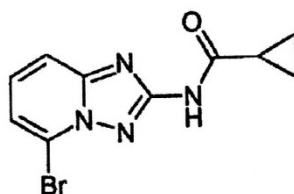
ytterligere rensing.  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,03 (1H, br s, NH), 8,81 (1H, d,  $J$  7,8 Hz, H-3), 8,15 (1H, br s, NH), 7,60 (1H, t,  $J$  8,0 Hz, H-4), 7,32 (1H, dd,  $J$  7,7 og 0,6 Hz, H-5), 4,31 (2H, q,  $J$  7,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1,35 (3H, t,  $J$  7,1 Hz,  $\text{CH}_3$ ).

5      1.1.2 5-brom-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-ylamin (3)



Til en suspensjon av hydroksylaminhydroklorid (101,8 g, 1,465 mol) i EtOH/MeOH  
 10 (1:1, 900 mL) tilsettes *N,N*-diisopropyletylamin (145,3 mL, 0,879 mol), og blandingen  
 omrøres ved romtemperatur (20°C) i 1 time. 1-(6-brom-pyridin-2-yl)-3-karboetoksy-  
 tiourea (2) (89,0 g, 0,293 mol) tilsettes deretter, og blandingen blir langsomt  
 oppvarmet til tilbakeløp (bemerk: blekeskrubber er nødvendig for å quenche utviklet  
 $\text{H}_2\text{S}$ ). Etter 3 timer med tilbakeløp, får blandingen avkjøle seg og filtreres for å  
 15 oppsamle de utfelte faste stoffer. Ytterligere produkt kan oppsamles ved avdamping i  
 vakuum av filtratet, ved tilsetning av  $\text{H}_2\text{O}$  (250 mL) og filtrering. De kombinerte  
 faststoffene ble vasket påfølgende med  $\text{H}_2\text{O}$  (250 mL), EtOH/MeOH (1:1, 250 mL) og  
 $\text{Et}_2\text{O}$  (250 mL), og ble deretter tørket i vakuum til å gi triazolpyridinderivatet (3) som  
 et fast stoff. Forbindelsen kan anvendes som sådan til neste trinn uten ytterligere  
 20 rensing.  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7,43-7,34 (2H, m, 2 x aromatic-H), 7,24 (1H, dd,  $J$   
 6,8 og 1,8 Hz, aromatic-H), 6,30 (2H, br,  $\text{NH}_2$ );  $m/z$  213/215 (1:1,  $\text{M}+\text{H}^+$ , 100 %).

1.1.3 Syklopropankarboksylsyre (5-brom-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-amid  
 (4):



25

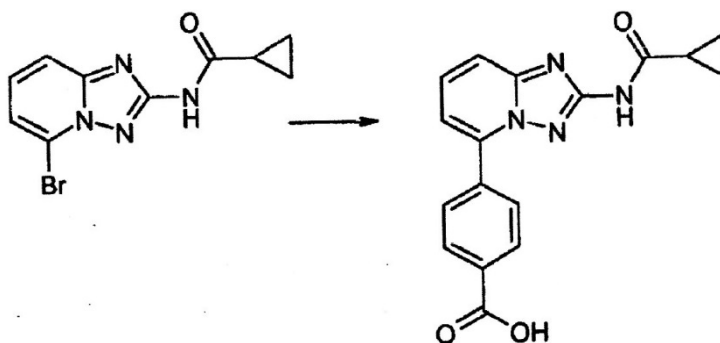
Til en oppløsning av 2-amino-triazolopyridin (3) (7,10 g, 33,3 mol) i tørr  $\text{CH}_3\text{CN}$  (150  
 mL) ble det ved 5°C tilsatt  $\text{Et}_3\text{N}$  (11,6 mL, 83,3 mmol) etterfulgt av  
 30 syklopropankarbonylchlorid (83,3 mmol). Reaksjonsblandingen ble deretter tillatt å  
 oppvarme til omgivelsestemperatur, og ble omrørt inntil alt utgangsmaterialet (3) er

oppbrukt. Om nødvendig, blir ytterligere Et<sub>3</sub>N (4,64 mL, 33,3 mmol) og syklopropankarbonylchlorid (33,3 mmol) tilsatt for å sikre fullstendig reaksjon. Etter løsemiddelavdampning i vakuum, behandles den resulterende rest med 7 N metanolisk ammoniakkoppløsning (50 mL) og ble omrørt ved omgivelsestemperatur (i 1-16 timer) for å hydrolysere eventuelt bis-acylert produkt. Produktisolasjon gjennomføres ved fjerning av flyktige forbindelser i vakuum, etterfulgt av triturering med Et<sub>2</sub>O (50 mL). Faststoffene samles ved filtrering, vaskes med H<sub>2</sub>O (2x50 mL), aceton (50 mL) og Et<sub>2</sub>O (50 mL) og tørkes deretter i vakuum til å gi det nødvendige brommellomprodukt (4).

### Synteseprosedyre for fremstilling av forbindelsen ifølge oppfinnelsen

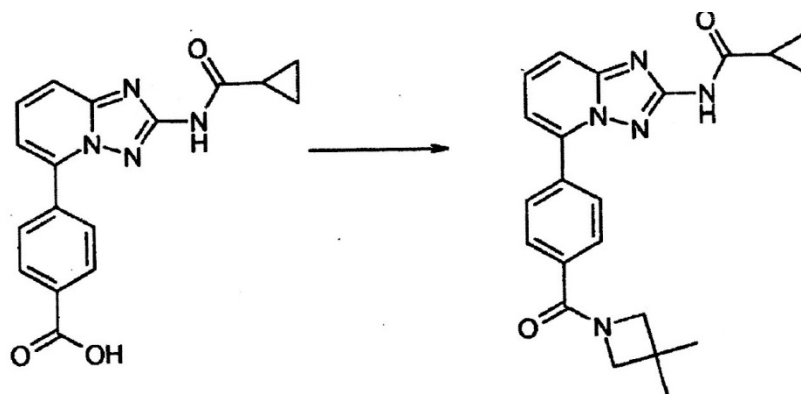
#### Forbindelse 1

Trinn 1: Suzukikobling



4-karboksyfenylborsyre (3,5 g, 0,021 mol) ble tilsatt til en oppløsning av syklopropankarboksylysyre (5-brom-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-amid (mellomprodukt 4, 5 g, 0,018 mol) i 1,4-dioksan/vann (5:1). K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,0 g, 0,036 mol) og PdCl<sub>2</sub>dppf (5 %) ble tilsatt til oppløsningen. Den oppnådde blanding ble deretter oppvarmet ved tradisjonell oppvarming i et oljebad ved 90°C i 16 timer. 1 M HCl-oppløsning ble tilsatt, og et presipitat ble dannet i den sure oppløsningen. Presipitatet ble filtrert, tørket under vakuum til å gi tittelforbindelsen og anvendt i det neste trinn uten ytterligere rensing.

Trinn 2: Syklopropankarboksylysyre {5-[4-(3,3-dimetyl-azetidin-1-karbonyl)-fenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid (forbindelse 1).



EDCI (3,59 g, 0,019 mol), HOBt (2,53 g, 0,019 mol) og DIPEA (4,48 mL) ble tilsatt til en oppløsning av 4-[2-(syklopropankarbonyl-amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-5-yl]-benzosyre (4 g, 0,012 mol) i DCM (150 mL) ved romtemperatur. Den oppnådde blanding ble omrørt i 10 minutter ved romtemperatur. Dimetylazetidinhydrokloridsalt (1,64 g, 0,013 mol) ble tilsatt til oppløsningen og reaksjonen ble omrørt i 16 timer. Vann ble tilsatt til reaksjonsblandingen. Det organiske laget ble separert og vasket med 2N NaOH-oppløsning, 2N HCl-oppløsning og vann. Den organiske fasen ble tørket over  $\text{MgSO}_4$ , filtrert og avdampet under vakuum. Rensing ved flashkromatografi (elueringsmiddel: 1:1 petrol/EtOAc til ren EtOAc) ga syklopropankarboksylsyre {5-[4-(3,3-dimetyl-azetidin-1-karbonyl)-fenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-2-yl}-amid.

Forbindelsen ifølge oppfinnelsen som er blitt eller kan fremstilles i henhold til syntesemetoden beskrevet heri, er angitt i tabell nedenfor. NMR-spektrum data for forbindelsen ifølge oppfinnelsen er gitt i tabell II.

**Tabell I: Massespektrumdata for forbindelsen ifølge oppfinnelsen**

| Forbindelse nr. | Struktur | Navn                                                                                                             | Molekylvekt | MS Mes'd |
|-----------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|
| 1               |          | Syklopropankarboksylsyre {5-[4-(3,3-dimetyl-azetidin-1-karbonyl)-fenyl]-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pyridin-2-yl}amid | 389,46      | 390,0    |

**Tabell II: NMR-data for forbindelsen ifølge oppfinnelsen**

| Forbindelse nr. | NMR-data ( $\delta$ )                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1               | ( $^1\text{H}$ , DMSO- $d_6$ ) 11,01 (1H, b, NH), 8,08 (2H, d, ArH), 7,79 (2H, d, ArH), 7,73 (1H, d, ArH), 7,72 (1H, s, ArH), 7,35 (1H, dd, ArH), 4,04 (2H, b, CH <sub>2</sub> ), 3,77 (2H, b, CH <sub>2</sub> ), 2,02 (1H, b, CH), 1,27 (6H, s, 2xCH <sub>3</sub> ), 0,81 (4H, m, 2xCH <sub>2</sub> ). |

### Biologiske eksempler

#### Eksempel 1 – in vitro analyser

##### Eksempel 1.1 JAK1-inhiberingsanalyse

Rekombinant human JAK1 (katalytisk domene, aminosyrer 866-1154; katalog nr. PV4774) ble innkjøpt fra Invitrogen. 1 ng JAK1 ble inkubert med 20 nM Ulight-JAK1( Tyr1023) peptid (Perkin Elmer, katalog nr. TRF0121) i kinasereaksjonsbuffer (25 mM MQPS pH 6,8, 0,016 % Brij-35, 8,33 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,33 mM DTT, 7  $\mu\text{M}$  ATP) med eller uten 4  $\mu\text{L}$  inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalvolum på 20  $\mu\text{L}$  i en hvit 384 Luminotrac 200 plate (Greiner, katalog nr. 781075). Etter 60 minutter ved romtemperatur ble reaksjonen stanset ved å tilsette 20  $\mu\text{L}$ /brønn av deteksjonsblanding (1 x deteksjonsbuffer (Perkin Elmer, katalog nr. CR97-100C), 0,5 nM Europium-anti-fosfotyrosin (PT66) (Perkin Elmer, katalog nr. AD0068), 10 mM EDTA). Utlesing gjennomføres ved å anvende Envision med eksitasjon ved 320 nm, og ved måling av emisjon ved 615 nm (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere relativ fluorescens-enheter (RFU) oppnådd i nærvær av en positiv kontrollinhibitor (10  $\mu\text{M}$  staurosporin) fra RFU oppnådd i nærvær av en vehikkel. Evnen hos en testforbindelse til å stabilisere denne aktivitet ble bestemt som:

$$\text{Prosentandel inhibering} = ((\text{RFU bestemt for prøve med testforbindelse tilstede} - \text{RFU bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor}) \div (\text{RFU bestemt i nærvær av vehikkel} - \text{RFU bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor})) \times 100.$$

25

Dosefortynningsserier ble fremstilt for forbindelsene som muliggjør testing av dose-respons effektene i JAK1-analysen, og beregning av IC<sub>50</sub> for forbindelsen. Hver forbindelse blir rutinemessig testet ved konsentrasjon på 20  $\mu\text{M}$  etterfulgt av en 1/5 seriefortynning, 8 punkter (20  $\mu\text{M}$  – 4  $\mu\text{M}$  – 800 nM – 160 nM – 32 nM – 6,4 nM – 1,28 nM – 0,26 nM) i en sluttkonsentrasjon på 1 % DMSO. Når styrken av forbindelsesserier økte, fremstilles flere fortynninger og/eller toppkonsentrasjonen blir

30

nedsatt (f.eks. 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M). Dataene er uttrykt som gjennomsnittlig IC<sub>50</sub> fra analysene  $\pm$  standard feil for gjennomsnittet.

**Tabell III: JAK1 IC<sub>50</sub>-verdier for forbindelse**

| Forbindelse nr. | JAK1 (nM)     |
|-----------------|---------------|
| 1               | 6,6 $\pm$ 0,7 |

5

*Eksempel 1.2 JAK1 Ki bestemmelsesanalyse*

For å bestemme Ki, ble forskjellige mengder inhibitor blandet med enzymet og den enzymatiske reaksjon ble fulgt som en funksjon av ATP-konsentrasjon. Ki ble bestemt ved hjelp av dobbel resiprok plotting av Km versus forbindelseskonsentrasjon (Lineweaver-Burk plott). JAK1 (Invitrogen, PV4774) ble anvendt med en sluttkonsentrasjon på 500 ng/ml. Substratet var Poly(Glu, Tyr)natriumsalt (4:1), molekyllvekt 20000-50000 (Sigma, P0275). Reaksjonen ble gjennomført i 25 mM Hepes pH 7,5; 0,01 % Tween 20, 10 mM MgCl<sub>2</sub> med varierende konsentrasjoner av ATP og forbindelse og ble stanset ved tilsetning av 150 mM fosforsyre. Måling av innlemmet fosfat i substratet polyGT ble gjennomført ved å overføre prøvene på en filterplate (ved anvendelse av en høster, Perkin Elmer), og med påfølgende vasking. Innlemmet <sup>33</sup>P i polyGT måles i en Topcount scintillasjonsteller etter tilsetning av scintillasjonsvæske til filterplatene (Perkin Elmer).

20

Når forbindelse 1 var testet i denne analysen, ble en Ki-verdi på 6,9 nM målt.

Alternativt, for bestemmelsen av Ki, ble forskjellige mengder inhibitor blandet med enzymet, og den enzymatiske reaksjon ble fulgt som en funksjon av ATP-konsentrasjon. Ki ble bestemt ved hjelp av dobbel resiprok plotting av Km versus forbindelseskonsentrasjon (Lineweaver-Burk plott). 1 ng JAK1 (Invitrogen, PV4774) ble anvendt i analysen. Substratet var 50 nM (Ulight-JAK1 (Tyr1023) peptid (Perkin Elmer, TRF0121). Reaksjonen ble gjennomført i 25 mM MOPS pH 6,8, 0,01 %, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub> Brij-35 med varierende konsentrasjoner av ATP og forbindelse. Fosforylert substrat ble målt ved å anvende et Eu-merket anti-fosfotyrosinantistoff PT66 (Perkin Elmer, AD0068). Utlesing ble gjennomført på EnVision (Perkin Elmer) med eksitasjon ved 320 nm og emisjon ved 615 nm og 665 nm.

35

Når forbindelse 1 var testet i denne analyse, ble en Ki-verdi på 5,6 nM målt.

*Eksempel 1.3 JAK2 inhiberingsanalyse*

Rekombinant human JAK2 (katalytisk domene, aminosyrer 866-1154; katalog nr. PV4210) ble innkjøpt fra Invitrogen. 0,0125 mU JAK2 ble inkubert med 25 nM Ulight-JAK1( Tyr1023) peptid (Perkin Elmer katalog nr. TRF0121) i kinasereaksjonsbuffer (41,66 mM HEPES pH 7,0, 0,016 % Triton X-100, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,33 mM DTT, 7,5 μM ATP) med eller uten 4 μL inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalvolum på 20 μL, i en hvit 384 Luminotrac 200 plate (Greiner, katalog nr. 781075). Etter 60 minutter ved romtemperatur, ble reaksjonen stanset ved å tilsette 20 μL/brønn deteksjonsblanding (1v x deteksjonsbuffer (Perkin Elmer, katalog nr. CR97-100C), 0,5 nM Europium-anti-fosfotyrosin (PT66) (Perkin Elmer, katalog nr. AD0068), 10 mM EDTA). Utlesing gjennomføres ved å anvende EnVision med eksitasjon ved 320 nm og ved å måle emisjon ved 615 nm (Perkin Elmer). Kinaseaktivitet ble beregnet ved å subtrahere relative fluorescensenheter (RFU) oppnådd i nærvær av en positiv kontrollinhibitor (10 μM staurosporin) fra RFU oppnådd i nærvær av vehikkel. En testforbindelses evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

Prosentandel inhibering = ((RFU bestemt for prøver med testforbindelse tilstede – RFU bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor) dividert med (RFU bestemt i nærvær av vehikkel – RFU bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor))\*100.

Dosefortynningsserier fremstilles for forbindelse som muliggjør testing av doseresponseeffektene i JAK2-analysen, og beregningen av IC<sub>50</sub> for forbindelsen. Hver forbindelse testes rutinemessig ved konsentrasjoner på 20 μM etterfulgt av en 1/5 seriefortynning, 8 punkter (20 μM – 4 μM – 800 nM – 160 nM – 32 nM – 6,4 nM – 1,28 nM – 0,26 nM) ved en sluttkonsentrasjon på 1 % DMSO. Når styrken til forbindelsesserier øker, fremstilles flere fortynninger og/eller toppkonsentrasjonen nedsettes (f.eks. 5 μM, 1 μM). Dataene er uttrykt som gjennomsnittlig IC<sub>50</sub> fra analysene ± standard feil for gjennomsnittet.

**Tabell IV: JAK2 IC<sub>50</sub>-verdier for forbindelse**

| Forbindelse nr. | JAK2 (nM) |
|-----------------|-----------|
| 1               | 67 ± 5    |

*Eksempel 1.4 JAK2 Ki bestemmelsesanalyse*

For bestemmelsen av  $K_i$  ble forskjellige mengder av inhibitor blandet med enzymet, og den enzymatiske reaksjonen ble fulgt som en funksjon av ATP-konsentrasjon.  $K_i$  ble bestemt ved gjennomsnittet av dobbel resiprok plotting av  $K_m$  versus forbindelseskonsentrasjon (Lineweaver-Burk plott). 0,024 mU JAK2 (Invitrogen, PV4210) ble anvendt i analysen. Substratet var Poly(Glu,Tyr)natriumsalt (4:1), MW 20000-50000 (Sigma, P0275). Reaksjonen ble gjennomført i 10 mM MOPS pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,01 % Brij-35, 1 mM DTT, 15 mM MgAc med varierende konsentrasjon av ATP og forbindelse, og ble stanset ved tilsetning av 150 mM fosforsyre. Måling av innlemmet fosfat i substrat polyGT ble utført ved å påføre prøvene på en filterplate (cellehøster, Perkin Elmer) og med påfølgende vasking. Innlemmelse av  $^{33}\text{P}$  i polyGT måles i en Topcount scintillasjonsteller etter tilsetning av scintillasjonsvæske til filterplatene (Perkin Elmer).

Når forbindelse 1 ble testet i denne analyse, ble en  $K_i$ -verdi på 126 nM målt.

Alternativt, for bestemmelsen av  $K_i$ , ble forskjellige mengder av inhibitor blandet med enzymet, og den enzymatiske reaksjonen ble fulgt som en funksjon av ATP-konsentrasjon.  $K_i$  ble bestemt ved hjelp av dobbel resiprok plotting av  $K_m$  versus forbindelseskonsentrasjon (Lineweaver-Burk plott). 0,0125 mU JAK2 (Invitrogen, PV4210) ble anvendt i analysen. Substratet var 50 nM Ulight-JAK-1 (Tyr1023) peptid (Perkin Elmer, TRF0121). Reaksjonen ble gjennomført i 25 mM HEPES pH 7,0, 0,01 % Triton X-100, 2 mM DTT, 7,5 mM  $\text{MgCl}_2$  med varierende konsentrasjoner av ATP og forbindelse. Fosforylert substrat ble målt ved å anvende et Eu-merket anti-fosfotyrosinantistoff PT66 (Perkin Elmer, AD0068). Utlesing ble gjennomført på EnVision (Perkin Elmer) med eksitasjon ved 320 nm og emisjon som fulgte ved 615 nm og 665 nm.

Når forbindelse 1 ble testet i denne analyse, ble en  $K_i$ -verdi på 35 nM målt.

### Eksempel 1.5 JAK3 inhiberingsanalyse

Rekombinant human JAK3 katalytisk domene (aminosyrer (781-1124; katalog nr. PV3855) ble innkjøpt fra Invitrogen. 0,025 mU JAK3 ble inkubert med 2,5  $\mu\text{g}$  polyGT-substrat (Sigma katalog nr. P0275) i kinasereaksjonsbuffer (25 mM Tris pH 7,5, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM b-glyserolfosfat, 0,01 % Triton X-100, 1  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv ATP, 0,25  $\mu\text{Ci}$   $^{33}\text{P}$ -gamma-ATP (GE Healthcare, katalog nr. AH9968) sluttkonsentrasjoner) med eller uten 5  $\mu\text{L}$  inneholdende testforbindelse eller vehikkel (DMSO, 1 % sluttkonsentrasjon), i et totalvolum på 25  $\mu\text{L}$ , i en polypropylen 96-

brønns plate (Greiner, V-bunn). Etter 105 minutter ved 30°C, blir reaksjonene stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. Alt av den terminerte

kinasereaksjonen ble overført til forvaskede (75 mM fosforsyre) 96-brønns plater (Perkin Elmer katalog nr. 6005177) ved å anvende en cellehøster (Perkin Elmer).

5 Plater ble vasket seks ganger med 300 µL pr. brønn av en 75 mM fosforsyreoppløsning, og bunnen til platene ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platen ble forseglet, og utlesning 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) 10 fra cpm oppnådd i nærvær av vehikkel. En testforbindelses evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som: Prosent inhibering = ((cpm bestemt for prøve med testforbindelse tilstede – cpm bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor) dividert med (cpm bestemt i nærvær av vehikkel – cpm bestemt for prøve med positiv kontrollinhibitor))\*100.

15

Dosefortynningsserier ble fremstilt fra forbindelsen som muliggjorde testing av dose-respons effekter i JAK3-analysen og beregningen av IC<sub>50</sub> for forbindelsen. Hver forbindelse ble rutinemessig testet ved 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 20 forbindelsesserien økte, ble flere fortynninger fremstilt og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5 µM, 1 µM). Dataene uttrykket som gjennomsnittlig IC<sub>50</sub> fra analysene ± standard feil av gjennomsnittet.

25

**Tabell V: JAK3 IC<sub>50</sub>-verdier for forbindelse**

| Forbindelse nr. | JAK3 (nM) |
|-----------------|-----------|
| 1               | 408 ± 62  |

#### *Eksempel 1.6 JAK3 Ki bestemmelsesanalyse*

30 For bestemmelsen av Ki ble forskjellige mengder inhibitor blandet med enzymet, og den enzymatiske reaksjonen ble fulgt som en funksjon av ATP-konsentrasjon. Ki ble bestemt ved hjelp av dobbel resiprok plottning av Km versus forbindelseskonsentrasjon (Lineweaver-Burk plott). JAK3 (Carna Biosciences, 09CBS-0625B) ble anvendt ved en sluttkonsentrasjon på 10 ng/ml. Substratet var Poly(Glu,Tyr)natriumsalt (4:1), molekylvekt 20000-50000 (Sigma, P0275). Reaksjonen ble gjennomført i 25 mM Tris 35 pH 7,5, 0,01 % Triton X-100, 0,5 mM EGTA, 2,5 mM DTT, 0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM b-

glyserolfosfat, 10 mM MgCl<sub>2</sub> med varierende konsentrasjoner av ATP og forbindelse, og ble stanset ved tilsetning av 150 mM fosforsyre. Måling av innlemmet fosfat i substratet polyGT ble gjennomført ved å påføre prøvene på en filterplate (ved anvendelse av en cellehøster, Perkin Elmer) og med etterfølgende vasking. Innlemmet <sup>33</sup>P i polyGT måles på en Topcount scintillasjonsteller etter tilsetning av scintillasjonsvæske til filterplatene (Perkin Elmer).

Når forbindelse 1 ble testet i denne analyse, ble en Ki-verdi på 188 nM målt.

#### Eksempel 1.7 TYK2 inhiberingsanalyse

Rekombinant human TYK2 katalytisk domene (aminoasyrer 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 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,1 % NP-40, 0,1 µM ikke-radioaktiv ATP, 0,125 µCi <sup>33</sup>P-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 minutter ved 30°C ble reaksjonene stanset ved å tilsette 25 µL/brønn av 150 mM fosforsyre. All den terminerte kinasereaksjonen ble overført til forvaskede (75 mM fosforsyre) 96-brønns filterplater (Perkin Elmer katalog nr. 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 platene ble forseglet. 40 µL/brønn av Microscint-20 ble tilsatt, toppen av platene ble forseglet, og utlesning 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. En testforbindelses evne til å inhibere denne aktivitet ble bestemt som:

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

Dosefortynningsserier ble fremstilt fra forbindelsene som muliggjør testing av doseresponseeffekter i TYK2-analysen og beregningen av IC<sub>50</sub> for forbindelsen. 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

forbindelsesserien økte, ble flere fortyndinger fremstilt og/eller toppkonsentrasjonen ble nedsatt (f.eks. 5  $\mu$ M/1  $\mu$ M).

**Tabell VI: TYK2 IC<sub>50</sub>-verdier for forbindelse**

| Forbindelse nr. | TYK2 (nM)    |
|-----------------|--------------|
| 1               | 219 $\pm$ 37 |

5

## Eksempel 2. Celleanalyser

### Eksempel 2.1 JAK-STAT signaleringsanalyse:

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

HeLa-celler ble anvendt ved 70 % konfluens for transfeksjon. 20000 celler i 87  $\mu$ L cellekulturmedium ble transient transfektert med 40 ng pSTAT1(2)-lusiferasereporter (Panomics), 8 ng LacZ-reporter som intern kontrollreporter, og 52 ng pBSK, ved anvendelse av 0,32  $\mu$ L Jeg-PEI (Polyplus) som transfeksjonsreagens pr. brønn i 96-brønns plateformat. Etter inkubasjon over natten ved 37°C ble 10 % CO<sub>2</sub>

transfeksjonsmedium fjernet. 75  $\mu$ L DMEM + 1,5 % varmeinaktivert føtalt kalveserum ble tilsatt. 15  $\mu$ L forbindelse ved 6,7 x konsentrasjon ble tilsatt i 60 minutter, og deretter 10  $\mu$ L human OSM (Peprotech) ved 33 ng/mL sluttkonsentrasjon.

Alle forbindelser ble testet in duplo ved å starte fra 20  $\mu$ M etterfulgt av en 1/3 seriefortynning, totalt 8 doser (20  $\mu$ M – 6,6  $\mu$ M – 2,2  $\mu$ M – 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 % CO<sub>2</sub>-celler lysert i 100  $\mu$ L lysisbuffer/brønn (PBS, 0,9 mM, CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % Trehalose, 0,025 % Tergitol NP9, 0,15 % BSA).

40  $\mu$ L cellelysat ble anvendt for å avlese  $\beta$ -galaktosidaseaktivitet ved å tilsette 180  $\mu$ L  $\beta$ Gal-oppløsning (30  $\mu$ L ONPG 4 mg/mL + 150  $\mu$ L  $\beta$ -galaktosidasebuffer (0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)) i 20 minutter. Reaksjonen ble stanset ved å tilsette 50  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Absorbans ble avlest ved 405 nm.

Lusiferaseaktivitet ble målt ved å anvende 40  $\mu$ L cellelysat pluss 40  $\mu$ L Steadylite® som beskrevet av produsenten (Perkin Elmer), på EnVision (Perkin Elmer).

35

10  $\mu\text{M}$  av en pan-JAK-inhibitor ble anvendt som en positiv kontroll (100 % inhibering). Som negativ kontroll ble 0,5 % DMSO (0 % inhibering) anvendt. Positive og negative kontroller ble anvendt for å beregne  $z'$  og "prosent inhibering" (PIN) verdier.

- 5 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.

10 PIN-verdier ble plottet for forbindelser testet ved doserespons og  $\text{EC}_{50}$ -verdier ble utledet.

**Tabell VII: STAT-signalerings  $\text{EC}_{50}$ -verdier for forbindelse**

| Forbindelse nr. | $\text{EC}_{50}$ (nM) |
|-----------------|-----------------------|
| 1               | $539 \pm 130$         |

15 *Eksempel 2.2 OSM/IL-1 $\beta$  signaleringsanalyse*

OSM og IL-1 $\beta$  ble vist til å synergistisk oppregulere MMP13-nivåer i human chondrosarkomcellelinje SW1353. Cellene ble utsådd i 96-brønns plater med 15000 celler/brønn i et volum på 120  $\mu\text{L}$  DMEM (Invitrogen) inneholdende 10 % (volum/volum) FBS og 1 % penicillin/streptomycin (Invitrogen) inkubert ved 37°C 5 % CO<sub>2</sub>. Celler ble preinkubert med 15  $\mu\text{L}$  forbindelse i M199-medium med 2 % DMSO 1 time før trigging med 15  $\mu\text{L}$  OSM og IL-1 $\beta$  for å nå 25 ng/mL OSM og 1 ng/mL IL-1 $\beta$ , og MMP13-nivåer ble målt i kondisjonert medium 48 timer etter trigging. MMP13-aktivitet ble målt ved å anvende en antistoffkapringsaktivitetsanalyse. For dette formål ble 384 brønns plater (NUNC, 460518, MaxiSorb sort) belagt med 35  $\mu\text{L}$  av en 1,5  $\mu\text{g/mL}$  anti-human 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  $\mu\text{L}$  5 % ikke-fettholdig tørrmelk (Santa Cruz, sc-2325, Blotto) i PBS i 24 timer ved 4°C. Deretter ble cellene vasket to ganger med PBS + 0,05 % Tween, og 35  $\mu\text{L}$  av 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  $\mu\text{L}$  av en 1,5 mM 4-aminofenylkvikksølvacetat (APMA) (Sigma, A9563) oppløsning og inkubasjon ved 37°C i 1 time. Brønnene ble vasket igjen med PBS + 0,05 % Tween, og 35  $\mu\text{L}$  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).

- 5 Prosentandel inhibering = ((fluorescens bestemt for tilstedeværelse av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve med testforbindelse tilstede) dividert med (fluorescens bestemt i nærvær av vehikkel – fluorescens bestemt for prøve uten trigger))\*100. Dataene er uttrykt som gjennomsnittlig EC<sub>50</sub> fra analysene  $\pm$  standard feil for gjennomsnittet.

10

**Tabell VIII: MMP13 EC<sub>50</sub>-verdier for forbindelser**

| Forbindelse nr. | EC <sub>50</sub> (nM) |
|-----------------|-----------------------|
| 1               | 4196 $\pm$ 2370       |

*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 timers BrdU-merking). Celler ble preinkubert med testforbindelser 1 time før IL-2-tilsetning. Celler ble dyrket i RPMI 1640 inneholdende 10 % (volum/volum) FBS.

20 *Eksempel 2.4 Fullblodsanalyser (WBA)*

*2.4.1 IFN $\alpha$  stimuleringsprotokoll*

- For å forutsi selektiviteten til testforbindelsene til å inhibere JAK1- i forhold til JAK2-avhengige signaleringsspor in vivo, ble en fysiologisk relevant in vitro modell utviklet ved å anvende humant fullblod. I WBA-analysen, ble blod tatt fra frivillige mennesker som ga informert samtykke behandlet ex vivo med forbindelse (1 time), og deretter 25 stimulert i enten 30 minutter med interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ , JAK1-avhengig spor) eller i 2 timer med granulocyt makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF, JAK2-avhengig spor).

30 *2.4.1.1 Fosfo-STAT1-analyse*

- For IFN $\alpha$ -stimulering, ble økning i fosforylering av Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (pSTAT1) ved IFN $\alpha$  i ekstrakter av hvite blodlegemer målt ved å anvende en pSTAT1 ELISA-analyse. Fosforylering av Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) etter interferon-alfa (IFN $\alpha$ )-triggering, er en JAK1-mediert 35 hendelse. Fosfo-STAT1-analysen som ble anvendt for å måle fosfo-STAT1-nivåer i

cellulære ekstrakter, ble utviklet for å vurdere en forbindelses evne til å inhibere JAK1-avhengige signaleringsspor.

5 Humant fullblod, tatt fra frivillige personer som ga informert samtykke ble behandlet ex vivo med forbindelse (1 time) og deretter stimulert i 30 minutter med IFN $\alpha$ . Økningen i fosforylering av STAT1 ved IFN $\alpha$  i ekstrakter av hvite blodlegemer ble målt ved å anvende en fosfo-STAT1 ELISA.

10 ACK lysisbuffer bestod av 0,15 M NH $_4$ Cl, 10 mM KHCO $_3$ , 0,1 mM EDTA. pH i bufferen var 7,3.

Et 10x cellelysisbufferkonsentrat (del av PathScan Phospho-STAT1 (Tyr701) sandwich ELISA kit fra Cell Signaling) ble fortynnet 10-ganger med H $_2$ O. Proteinaseinhibitorer ble tilsatt til bufferen før bruk.

15 20  $\mu$ g IFN $\alpha$  oppløst i 40  $\mu$ L H $_2$ O for å oppnå en 500  $\mu$ g/mL stamoppløsning. Stamoppløsningen ble lagret ved -20°C.

En 3-ganger fortynningsserie av forbindelsen ble fremstilt i DMSO (høyeste konsentrasjon: 10 mM). Deretter ble forbindelsen ytterligere fortynnet i medium (fortynningsfaktor avhengig av ønsket sluttforbindelseskonsentrasjon).

#### *2.4.1.1.1 Inkubasjon av blod med forbindelse og stimulering i IFN $\alpha$*

25 Humant blod ble samlet i heparinrør. Blodet ble oppløst i prøver på 392  $\mu$ L. Etterpå ble 4  $\mu$ L forbindelsesfortynning tilsatt til hver prøve, og blodprøvene ble inkubert i 1 time ved 37°C. IFN $\alpha$ -stamoppløsningen ble fortynnet 1000-ganger i RPMI-medium for å oppnå en 500 ng/ml arbeidsoppløsning. 4  $\mu$ L av 500 ng/mL arbeidsoppløsning ble tilsatt til blodprøvene (sluttkonsentrasjon IFN $\alpha$ : 5 ng/ml). Prøvene ble inkubert ved 37°C i 30 minutter.

30

#### *2.4.1.1.2 Fremstilling av celleekstrakter*

På slutten av stimuleringsperioden ble 7,6 ml ACK-buffer tilsatt til blodprøvene for å lysere de røde blodcellene. Prøvene ble blandet ved å vende rørene opp-ned fem ganger, og reaksjonen ble inkubert på is i 5 minutter. Lysis av RBC bør være tydelig under denne inkubasjon. Cellene ble pelletert ved sentrifugering ved 300 g, 4°C i 7 minutter og supernatanten ble fjernet. 10 mL 1x PBS ble tilsatt til hvert rør, og cellepelleten ble resuspendert. Prøvene ble sentrifugert igjen i 7 minutter ved 300 g,

35

4°C. Supernatanten ble fjernet, og pelleten ble resuspendert i 500 µL 1x PBS. Deretter ble celsuspensjonen overført til et rent 1,5 mL mikrosentrifugerør. Cellene ble pelletert ved sentrifugering ved 700 g i 5 minutter ved 4°C. Supernatanten ble fjernet, og pelleten ble oppløst i 150 µL celle lysisbuffer. Prøvene ble inkubert på is i 15 minutter. Etter dette ble prøvene lagret ved -80°C inntil ytterligere prosessering.

#### 2.4.1.1.3 Måling av STAT1-fosforylering ved ELISA

Pathscan Phospho-STAT1 (Tyr701) Sandwich ELISA kit fra Cell Signaling (kat.nr. 7234) ble anvendt for å bestemme Phospho-STAT1-nivåer.

10

Celleekstraktene ble tint på is. Rørene ble sentrifugert i 5 minutter ved 16000 g, 4°C, og de klarede lysater ble høstet. I mellomtiden ble mikrobrønnstrips fra kittet ekvilibrert til romtemperatur, og vaskebuffer ble fremstilt ved å fortynne 20 x vaskebuffer i H<sub>2</sub>O. Prøver ble fortynnet 20-ganger i prøvefortynning, og 100 µL ble tilsatt til mikrobrønnstripsene. Stripsene ble inkubert over natten ved 4°C.

15

Den etterfølgende dag ble brønnene vasket tre ganger med vaskebuffer. 100 µL av deteksjonsantistoffet ble tilsatt til brønnene. Stripsene ble inkubert ved 37°C i 1 time. Deretter ble brønnene vasket tre ganger med vaskebuffer igjen. 100 µL HRP-koblet sekundært antistoff ble tilsatt til hver brønn, og prøvene ble inkubert ved 37°C. Etter 30 minutter ble brønnene vasket tre ganger igjen, og 100 µL TMB-substrat ble tilsatt til alle brønnene. Da prøvene ble blå, ble 100 µL STOP-oppløsning tilsatt for å stanse reaksjonen. Absorbans ble målt ved 450 nm.

20

#### 2.4.1.2 IL-8 ELISA

25

For GM-CSF-stimulering, ble økning i interleukin-8 (IL-8) nivåer i plasma målt ved å anvende en IL-8 ELISA-analyse. Granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF)-indusert interleukin 8 (IL-8) ekspresjon er en JAK2-mediert hendelse. IL-8 ELISA som kan anvendes for å måle IL-8-nivåer i plasmaprøver ble utviklet for å fastslå en forbindelses evne til å inhibere JAK2-avhengig signaleringsspor.

30

Humant fullblod, tatt fra voksne frivillige som ga informert samtykke, ble ex vivo behandlet med forbindelse (1 time) og deretter stimulert i 2 timer med GM-CSF. Økning i IL-8-nivåer i plasma ble målt ved å anvende en IL-8 ELISA-analyse.

35

10 µg GM-CSF ble oppløst i 100 µL H<sub>2</sub>O for å oppnå en 100 µg/mL stamoppløsning. Stamoppløsningen ble lagret ved -20°C.

En tre-ganger fortytningsserie av testforbindelsen ble fremstilt i DMSO (høyeste konsentrasjon: 10 mM). Deretter ble forbindelsen ytterligere fortynnet i medium (fortynningsfaktor avhengig av ønsket sluttforbindelseskonsentrasjon).

5

#### *2.4.1.2.1 Inkubasjon av blod med forbindelse og stimulering med GM-CSF*

Humant blod ble samlet i hepariniserte rør. Blodet ble oppløst i prøver på 245 µL.

Deretter ble 2,5 µL testforbindelsesfortynning tilsatt til hver prøve, og blodprøvene ble inkubert i 1 time ved 37°C. GM-CSF-stamoppløsningen ble fortynnet 100-ganger i

10

RPMI-medium for å oppnå en 1 µg/mL arbeidsoppløsning. 2,5 µL av 1 µg/mL

arbeidsoppløsning ble tilsatt til blodprøvene (sluttkonsentrasjon GM-CSF: 10 ng/mL).

Prøvene ble inkubert ved 37°C i 2 timer.

#### *2.4.1.2.2 Fremstilling av plasmaprøver*

15

Prøvene ble sentrifugert i 15 minutter ved 1000 g, 4°C. 100 µL av plasmaet ble høstet og lagret ved -80°C inntil videre bruk.

#### *2.4.1.2.3 Måling av IL-8-nivåer ved ELISA*

Human IL-8 Chemiluminescent Immunoassay kit fra R&D Systems (kat. Nr. Q8000B)

20

ble anvendt for å bestemme IL-8-nivåer.

Vaskebuffer ble fremstilt ved å fortynne 10 x vaskebuffer i H<sub>2</sub>O. Arbeids-glo-reagens ble fremstilt ved å tilsette 1 del Glo-reagens 1 til 2 deler Glo-reagens B 15 minutter til 4 timer før bruk.

25

100 µL analysefortynningsmiddel RDI-86 ble tilsatt til hver brønn. Etter dette ble 50 µL prøve (plasma) tilsatt. ELISA-platen ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur, 500 rpm. Alle brønner ble vasket fire ganger med vaskebuffer, og 200 µL IL-8-konjugat ble tilsatt til hver brønn. Etter inkubasjon i 3 timer ved romtemperatur, ble brønnene vasket 4 ganger med vaskebuffer og 100 µL arbeids-glo-reagens ble tilsatt til hver brønn. ELISA-platen ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur (beskyttet mot lys). Luminescens ble målt (0,5 s/brønn avlesningstid).

30

#### *2.4.1.3 Resultater*

35

pIC<sub>50</sub> for forbindelse I for inhibering av INFα-indusert økning for pSTAT1-nivåer var  $6,32 \pm 0,07$  (SEM), mens pIC<sub>50</sub> inhibering for GM-CSF-indusert økning av IL-8 var  $4,87 \pm 0,13$  (SEM) (resultater oppnådd ved å anvende 6 bloddonorere). Dette viser at

forbindelse 1 er 28-ganger mer selektiv for JAK1-sporet versus JAK2-sporet. I en cellulær setting er det derfor klart at forbindelse 1 utviser selektivitet for JAK1 i forhold til JAK2. Forbindelse 1 synes å utvise en større selektivitet for JAK1 i forhold til JAK2, sammenliknet med kjente strukturelt relaterte forbindelser eller andre kjente JAK-inhibitorer.

#### 2.4.1.3 Datakureringsbehandling og resultater

For ytterligere å videreutvikle resultatene, ble inhibering av fosfoSTAT1-induksjon ved IFN $\alpha$  i celleekstrakter eller inhibering av IL-8-induksjon ved GM-CSF i plasma plottet mot forbindelseskonsentrasjonen, og IC<sub>50</sub>-verdiene ble avledet ved å anvende Graphpad software. Data ble bibeholdt dersom R<sup>2</sup> var større enn 0,8 og helningen var mindre enn 3, og kun donorer fra hvilke gyldige data ble oppnådd for begge analyser ble bibeholdt.

Når underkastet denne ytterligere dataanalyseprotokoll, var målte pIC<sub>50</sub> for forbindelse 1 med hensyn til å inhibere den INF $\alpha$ -induserte økning av pSTAT1-nivåer f.eks.  $6,21 \pm 0,09$  (SEM), mens pIC<sub>50</sub> for inhibering av GM-CSF-indusert økning av IL-8 var  $4,97 \pm 0,14$  (SEM) (resultater oppnådd ved å anvende 6 bloddonorer). Dette bekrefter at forbindelse 1 var 17,6-ganger mer selektiv for JAK1-sporet versus JAK2-sporet. I en cellulær setting er det således klart at forbindelse 1 utviser selektivitet for JAK1 i forhold til JAK2. Forbindelse 1 synes å utvise en større selektivitet for JAK1 i forhold til JAK2 sammenliknet med kjente strukturelt relaterte forbindelser eller andre kjente JAK-inhibitorer.

#### 2.4.2 IL-6 stimuleringsprotokoll

En flow-cytometrianalyse ble også gjennomført for å etablere forbindelsesselektivitet for JAK1 i forhold til JAK2 ex vivo ved å anvende humant fullblod. Blod ble derfor tatt fra humane frivillige som ga informert samtykke. Blod ble deretter ekvilibret i 30 minutter ved 37°C med forsiktig rysting, og deretter ble det fordelt i Eppendorf-rør. Forbindelsen ble tilsatt ved forskjellige konsentrasjoner, og inkubert ved 37°C i 30 minutter under forsiktig rysting, og deretter stimulert i 20 minutter ved 37°C under forsiktig rysting med interleukin 6 (IL-6) for JAK1-avhengig sporstimulering eller GM-CSF for JAK2-avhengig sporstimulering. Fosfo-STAT1 og fosfo-STAT5 ble deretter evaluert ved å anvende FACS-analyser.

##### 2.4.2.1 Fosfo-STAT1-analyser

For IL-6-stimulert øking av Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (pSTAT1) fosforylering i hvite blodceller, ble humant fullblod, tatt fra humane frivillige som ga informert samtykke, behandlet ex vivo med forbindelsen i 30 minutter og deretter stimulert i 20 minutter med IL-6. Økningen i fosforylering av STAT1 ved IL-6 i lymfocytter ble målt ved å anvende anti-fosfo-STAT1-antistoff ved FACS.

5X Lyse/Fix-bufferen (BD PhosFlow, kat. nr. 558049) ble fortynnet 5-ganger med destillert vann og forvarmet ved 37°C. Gjenværende fortynnet Lyse/Fix-buffer ble fjernet.

10

10 µg rhIL-6 (R&D Systems, kat. nr. 206-IL) ble oppløst i 1 ml PBS 0,1 % BSA for å oppnå en 10 µg/ml stamoppløsning. Stamoppløsningen ble lagret i prøvemengder ved -80°C.

15 En 3-ganger fortynningsserie av forbindelsen ble fremstilt i DMSO (10 mM stamoppløsning). Kontrollbehandlede prøver mottok DMSO i stedet for forbindelse. Alle prøver ble inkubert med en 1 % endelig DMSO-konsentrasjon.

#### *2.4.2.1.1 Inkubasjon av blod med forbindelse og stimulering med IL-6*

20 Humant blod ble samlet i hepariniserte rør. Blodet ble oppdelt i prøvemengder på 148,5 µl. Deretter ble 1,5 µl av forbindelsesfortynning tilsatt til hver prøvemengde, og blodprøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37°C under forsiktig rysting. IL-6-stamoppløsning (1,5 µl) ble tilsatt til blodprøvene (sluttkonsentrasjon 10 ng/ml), og prøvene ble inkubert ved 37°C i 20 minutter under forsiktig rysting.

25

#### *2.4.2.1.2 Fremstilling av hvite blodlegemer og CD4-merking*

På slutten av stimuleringsperioden ble 3 ml 1X forvarmet Lyse/Fix-buffer umiddelbart tilsatt til blodprøvene, vortex-blandet kort og inkubert i 15 minutter ved 37°C i et vannbad for å lysere røde blodceller og fikse leukocytter, deretter frosset ved -80°C inntil videre bruk.

30

For de etterfølgende trinn ble rør tinet ved 37°C i omtrent 20 minutter, og sentrifugert i 5 minutter ved 400 g ved 4°C. Cellepelletten ble vasket med 3 ml kald 1X PBS, og etter sentrifugering ble cellepelletten resuspendert i 100 µl PBS inneholdende 3 % BSA. FITC-konjugert anti-CD4-antistoff eller kontroll FITC-konjugert isotype antistoff ble tilsatt og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur, i mørket.

35

#### 2.4.2.1.3 Cellepermeabilisering og merking med anti-fosfo-STAT1-antistoff

Etter vasking av celler med 1X PBS, ble cellepelletten resuspendert i 100 µl iskald 1X PBS og 900 µl iskald 100 % metanol ble tilsatt. Celler ble deretter inkubert ved 4°C i 30 minutter for permeabilisering.

5

Permeabiliserte celler ble deretter vasket med 1X PBS inneholdende 3 % BSA, og ble til slutt resuspendert i 80 µl 1X PBS inneholdende 3 % BSA.

10

20 µL PE mus anti-STAT1 (pY701) eller PE mus IgG2a $\kappa$  isotype kontrollantistoff (BD Biosciences, henholdsvis kat. nr. 612564 og 559319) ble tilsatt og blandet, deretter inkubert i 30 minutter ved 4°C, i mørket.

15

Celler ble deretter vasket én gang med 1X PBS og analysert på et FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

#### 2.4.2.1.4 Fluorescensanalyse på FACSCanto II

20

50000 totale hendelser ble talt, og fosfo-STAT1-positive celler ble målt etter utløsning på CD4<sup>+</sup>-celler, i lymfocytporten. Data ble analysert ved å anvende FACSDiva software, og tilsvarende prosentandelen inhibering av IL-6-stimulering beregnet på prosentandel positive celler for fosfo-STAT1 på CD4<sup>+</sup>-celler.

#### 2.4.2.2 Fosfo-STAT5-analyse

25

For GM-CSF-stimulert økning av Signal Transducers and Activators of Transcription 5 (pSTAT5) fosforylering i hvite blodlegemer, ble humant fullblod tatt fra humane frivillige som ga informert samtykke behandlet ex vivo med forbindelse i 30 minutter, og ble deretter stimulert i 20 minutter med GM-CSF. Økningen i fosforylering av STAT5 ved GM-CSF i monocytter ble målt ved å anvende et anti-fosfo-STAT5-antistoff ved FACS.

30

5X Lyse/Fix-bufferen (BD PhosFlow, kat. nr. 558049) ble fortynnet 5-ganger med destillert vann, og forvarmet ved 37°C. Gjenværende fortynnet Lyse/Fix-buffer ble fjernet.

35

10 µg rhGM-CSF (AbCys S.A., kat. nr. P300-03) ble oppløst i 100 µl PBS 0,1 % BSA for å oppnå en 100 µg/ml stamoppløsning. Stamoppløsningen ble lagret i prøvemengder ved -80°C.

En 3-ganger fortynningsserie av forbindelsen ble fremstilt i DMSO (10 mM stamoppløsning). Kontrollbehandlede prøver mottok DMSO uten noe testforbindelse. Alle prøver ble inkubert med en 1 % endelig DMSO-konsentrasjon.

#### 5      2.4.2.2.1 Inkubasjon av blod med forbindelse og stimulering med GM-CSF

Humant blod ble samlet i hepariniserte rør. Blodet ble oppdelt i prøvemengder på 148,5 µl. Deretter ble 1,5 µl av forbindelsesfortynning tilsatt til hver prøvemengde, og blodprøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37°C under forsiktig rysting. GM-CSF-stamoppløsning (1,5 µl) ble tilsatt til blodprøvene (sluttkonsentrasjon 20 pg/ml), og  
10      prøvene ble inkubert ved 37°C i 20 minutter under forsiktig rysting.

#### 2.4.2.2.2 Fremstilling av hvite blodlegemer og CD14-merking

På slutten av stimuleringsperioden ble 3 ml av 1X forvarmet Lyse/Fix-buffer umiddelbart tilsatt til blodprøvene, vortex-blandet kort og inkubert i 15 minutter ved  
15      37°C i et vannbad for å lysere røde blodlegemer og fiksere leukocytter, deretter frosset ved -80°C inntil videre bruk.

For de etterfølgende trinn ble rør tint ved 37°C i omtrent 20 minutter, og sentrifugert i 5 minutter ved 400 g ved 4°C. Cellepelleten ble vasket med 3 ml kald 1X PBS, og etter  
20      sentrifugering ble cellepelleten resuspendert i 100 µl PBS inneholdende 3 % BSA. FITC mus anti-CD14-antistoff (BD Biosciences, kat. nr. 345784) eller kontroll FITC mus IgG2bκ isotypeantistoff (BD Biosciences, kat. nr. 555057) ble tilsatt og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur i mørket.

#### 25      2.4.2.2.3 Cellepermeabilisering og merking med anti-fosfo-STAT5-antistoff

Etter vasking av celler med 1X PBS, ble cellepelleten resuspendert i 100 µl iskald 1X PBS og 900 µl iskald 100 % metanol ble tilsatt. Celler ble deretter inkubert ved 4°C i 30 minutter for permeabilisering.

30      Permeabiliserte celler ble deretter vasket med 1X PBS inneholdende 3 % BSA, og ble til slutt resuspendert i 80 µl 1X PBS inneholdende 3 % BSA.

20 µL PE mus anti-STAT5 (pY694) eller PE mus IgG1κ isotype kontrollantistoff (BD Biosciences, henholdsvis kat. nr. 612567 og 554680), ble tilsatt og blandet, og  
35      deretter inkubert i 30 minutter ved 4°C i mørket.

Celler vaskes deretter én gang med 1X PBS, og ble analysert på et FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

#### 2.4.2.2.4 Fluorescensanalyser på FACSCanto II

5 50000 totale hendelser ble talt, og fosfo-STAT5-positive celler ble målt etter utløsning ("gating") på CD15+-celler. Data ble analysert ved å anvende FACSDiva software, og svarer til prosentandel inhibering av GM-CSF-stimulering beregnet på prosentandel av positive celler for fosfo-STAT5 på CD14+-celler.

#### 10 2.4.2.3 Resultater

Når underkastet denne protokoll, ble prosentandel inhibering (PIN) oppnådd fra gjennomsnittlig 3 friske frivillige bestemt for forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Forbindelse 1 ble f.eks. testet og ga en  $pIC_{50} = 6,61$  ved inhibering av STAT1-fosforylering og en  $pIC_{50} = 5,37$  ved inhibering av STAT5-fosforylering.

15

Ved sammenlikning av effekten av forbindelse 1 på STAT1 (JAK1-avhengig spor) og STAT5 (JAK2-avhengig spor), ble en 17,6 ganger selektivitet for JAK1 versus JAK2 målt.

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  
 25 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.

30

##### *3.1.2 Dyr*

Mørke Agouti-rotter (hanner, 7-8 uker gamle) ble oppnådd fra Harlan Laboratories (Maison-Alfort, Frankrike). DBA/IL-mus (hanner, 7 uker gamle) ble oppnådd fra Centre d'Elevage et de Reproduction JANVIER (CERJ) (Laval, Frankrike). Rotter og mus ble holdt ved en 12 timers lys/mørke-syklus (0700-1900). Temperaturen ble  
 35 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 hjelp av en homogenisator i en for-avkjølt glassflaske i et isvannbad. Ekstra adjuvans og forlenget homogenisering kan være nødvendig dersom en emulsjon ikke dannes.

Mus: 0,1 mL av emulsjonen ble injisert intradermalt i halebasen til hver mus på dag 1, og en annen booster intradermal injeksjon (CII-oppløsning på 1 mg/mL i CFA 0,1 mL saltvann) ble gjennomført på dag 21. Denne immuniseringsmetode var modifisert fra publiserte metoder (David D Brand Kary A Latham, & Edward F Rosloniec. Collagen-induced arthritis. Nature Methods 2 (5): 1269-1275. 2007).

Rotte: 0,2 mL av emulsjonen injiseres intradermalt i halebasen til hver rotte på dag 1, og en andre booster intradermal injeksjon (CII-oppløsning ved 2 mg/mL i CFA 0,1 mL saltvann) gjennomføres på dag 9. Denne immuniseringsmetode er modifisert fra publiserte metoder (Sims NA et al., (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, Arthritis Rheum. 50 2338-2346; Jou et al., 2005).

#### 3.1.4 Studiedesign

De terapeutiske effekter av testforbindelsene ble testet i rotte eller mus CIA-modellen. Dyr ble oppdelt tilfeldig i like grupper, og hver gruppe inneholdt 10 dyr. Alle rottene er immunisert på dag 1, og blir boostet på dag 9. Alle musene ble immunisert på dag 1, og ble boostet på dag 21. 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 uke, s.c.). En forbindelse av interesse ble typisk testet i 3 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 artritt-skår 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 poten, som inkluderer tær; 4 - maksimalt betent lem med involvering av flere ledd (maksimal kumulativ klinisk artritt-skår 16 pr. dyr) (Nishida et al., 2004).

For å tillate meta-analysen av multiple studier, ble de kliniske skårverdiene normalisert som følger:

5 *AUC av klinisk skår (AUC-skår):* Arealet under kurven (AUC) fra dag 1 til dag 14 ble beregnet for hver individuelle rotte. AUC for hvert dyr ble dividert med gjennomsnittlig AUC oppnådd for vehikkelen i studien, hvorfra dataene fra dette dyret var oppnådd, og ble multiplisert med 100 (dvs. AUC ble uttrykt som en prosentandel av den gjennomsnittlige vehikkel AUC pr. studie).

10

*Klinisk skår økning fra dag 1 til dag 14 (endepunktskår):* Den kliniske skår-forskjellen for hvert dyr ble dividert med den gjennomsnittlige kliniske skår-forskjellen oppnådd for vehikkelen i studien, hvorfra dataene på dette dyret var oppnådd, og ble multiplisert med 100 (dvs. forskjellen ble uttrykt som en prosentandel av den gjennomsnittlig kliniske skår-forskjellen for vehikkelen pr. studie).

15

### *3.1.6 Forandring i kroppsvekt (%) etter utbrudd 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 forandringer i kroppsvekt etter utbrudd av artritt kunne anvendes som et ikke-spesifikt endepunkt for å evaluere effekten av terapeutika i rottemodellen. Forandringen i kroppsvekt (%) etter utbrudd av artritt ble beregnet som følger:

20

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

25

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

### *3.1.7 Larsens skår:*

Post-mortem ble Larsens skår utledet fra begge bakpoter til alle rottene av minst 2 forskere. Gjennomsnittet av disse skår ble beregnet for å oppnå en Larsens skår pr. rotte. For å tillate en inter-studie sammenlikning av Larsens skår, ble Larsens skår for hver rotte dividert med den gjennomsnittlige Larsens skår oppnådd fra vehikkelen i studien som rotten tilhører, og ble multiplisert med 100 (dvs. å uttrykke Larsens skår som prosentandelen av gjennomsnittlig vehikkel Larsens skår pr. studie). Det gjennomsnittlige Larsens skår for de forskjellige behandlingsgrupper ble beregnet og sammenliknet.

35

### 3.1.8 Radiologi

Røtgenfotografier ble tatt av bakpoter til hvert individuelle dyr. Et tilfeldig blindidentitetsnummer ble angitt for hvert av fotoene og alvorligheten av benerosjon ble rangert ved to uavhengige skårer med radiologisk Larsens skår system som følger:

5 0 – normal med intakt benede konturer og normale leddmellomrom; 1 – lett unormalitet hos hvilket som helst én eller to av de ytre metatarsalben som viser lett benerosjon; 2 – klar tidlig unormalitet med hvilke som helst av tre til fem av de ytre metatarsalben som viser benerosjon; 3 – medium destruktiv unormalitet med alle de ytre metatarsalben, så vel som hvilken som helst ene eller to av de indre

10 metatarsalben som viser klare benerosjoner; 4 – alvorlig destruktiv unormalitet med alle de metatarsale ben som viser klar benerosjon, og hvor minst ett av de indre metatarsal-leddene er fullstendig erodert, og etterlater kun benede leddkonturer som delvis er preservert; 5 – multilating unormalitet uten benkonturer. Dette skåringssystem er en modifikasjon fra Salvemini et al., 2001; Bush et al., 2002; Sims

15 et al., 2004; Jou et al., 2005.

### 3.1.9 Histologi

Etter radiologisk analyse ble bakpoten til mus fiksert i 10 % fosfatbufret formalin (pH 7,4), dekalsifisert med raskt bendekalsifiseringsmiddel for finhistologi (Laboratories

20 Eurobio) og ble innesluttet i parafin. For å sikre omfattende evaluering av artrittiske ledd, ble minst fire seriesnitt (5 µm tykkelse) serie av snitt hadde en avstand på 100 µm. Snittene ble farget med hematoksylin og eosin (H&E). Histologisk undersøkelse for synovial inflammasjon og benskade og bruskskade, ble gjennomført med dobbelt blindtest. I hver pote ble fire parametere vurdert ved å anvende en fire-punkt skala.

25 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 representerte en ytterligere skår, nemlig "RA total skåren". For å tillate en interstudiesammenlikning av de histologiske utlesinger, ble total histologiskår for hver rotte dividert med gjennomsnittlig total

30 histologiskår oppnådd for vehikkel i studien som rotten tilhører, og ble multiplisert med 100 (dvs. som uttrykker den totale histologiskår som prosentandelen er gjennomsnittlig vehikkel total histologiskår pr. studie). Gjennomsnittlig total histologiskår for de forskjellige behandlingsgrupper ble beregnet og sammenliknet.

### 35 3.1.10 Mikro-computertomografi (µCT) analyse av calcaneus (hælben):

Bendegradering observert i RA forekommer særlig i det kortikale ben, og kan vises ved µCT-analyse (Sims NA et al., 2004; Oste L et al., ECTC Montreal 2007). Etter

skanning og 3D volumrekonstruksjon av calcaneus-benet, ble bendeogradering målt som antall atskilte objekter tilstede pr. bilde, isolert in silico perpendikulært på benets lengdeakse. Desto mer av benet som var degradert, desto flere atskilte objekter ble målt. 1000 bilder, jevnt fordelt langs calcaneus (avstand omtrent 10,8 µm) ble analysert.

### 3.1.11 Resultater

Forbindelse 1 ble testet i mus CIA-studien ved 30 mg/kg, og i rotte CIA-studien ved 30, 10, 3 og 1 mg/kg. Forbindelse 1 var effektiv i alle utlesninger gjennomført i rotte CIA-studien, med statistisk signifikans i flere av utlesningene, og særlig ble signifikante forbedringer sett for AUC for den kliniske skåren (fra 10 mg/kg), endepunkt klinisk skår (fra 1 mg/kg), Larsens skår (fra 30 mg/kg) og potesvelling (fra 1 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 modellen anvendes for å analysere eventuelle blokkere av TNF-frigivelse in vivo.

Seks BALB/cJ hunnmus (20 g) pr. gruppe ble behandlet ved den tiltenkte dosering én gang, p.o. Tretti minutter senere blir LPS (15 µg/kg; E. coli serotype 0111:B4) injisert i.p. Nitti minutter senere ble mus avlivet, og blod ble samlet. Sirkulerende TNFalfa-nivåer bestemmes ved å anvende kommersielt tilgjengelige ELISA-kit. Deksametason (5 µg/kg) anvendes som en referanse antiinflammatorisk forbindelse. Valgte forbindelser ble testet ved én eller flere doser, f.eks. 3 og/eller 10, og/eller 30 mg/kg. p.o.

Forbindelse 1 utviste en statistisk signifikant reduksjon i TNF-frigivelsen (> 50 %) ved 30 mg/kg p.o.

30

### 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 injiseres i.v. med en cocktail av mAb'er rettet mot kollagen II. Kun én dag senere initieres forbindelsesbehandling (vehikkel: 10 % (volum/volum) HPβCD). Tre dager senere mottok mus en i.p. LPS-injeksjon (50 µg/mus), som resulterte i et hurtig utbrudd av inflammasjon.

35

Forbindelsesbehandling fortsatte inntil ti dager etter mAb-injeksjon. Inflammasjon avleses ved å måle potesvelling, og ved registrering av den kliniske skår for hver pote. Den kumulative kliniske artrittskåren fra fire lemmer er angitt for å vise alvorligheten av inflammasjon. Et skåringssystem anvendes for hvert lem ved å anvende en skala på 0-4, hvor 4 er den mest alvorlige inflammasjon.

- 0 Symptomfri
- 1 Mild, men klar rødhet og svelling av én type av ledd, slik som ankel eller 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 poten som inkluderer tær
- 4 Maksimalt betent lem med involvering av flere ledd

#### Eksempel 3.4 Onkologimodeller

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

#### Eksempel 3.5 Mus IBD-modell

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

#### Eksempel 3.6 Mus astmamodell

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

### 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.

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

Etter 24 timer blir 800  $\mu\text{L}$  av prøven overført til et eppendorf-rør og sentrifugert i 5 minutter ved 14000 rpm. 200  $\mu\text{L}$  av supernatanten i prøven blir deretter overført til en MultiscreenR Solubility Plate (Millipore, MSSLBPC50), og supernatanten filtreres (10-12" Hg) ved hjelp av en vakuummanifold inn i en ren Greiner polypropylen V-bunn 96-brønns plate (kat. nr. 651201). 5  $\mu\text{L}$  av filtratet fortynnes inn i 95  $\mu\text{L}$  (F20) av den samme bufferen anvendt for å inkubere i platen som inneholder standardkurven (Greiner, kat. nr. 651201).

Standardkurven for forbindelsen fremstilles i nylaget DMSO fra en 10 mM DMSO fortynnet faktor 2 stamoppløsning i DMSO (5000  $\mu\text{M}$ ), og ble deretter ytterligere fortynnet i DMSO opp til 19,5  $\mu\text{M}$ . 3  $\mu\text{L}$  av fortynningsserien som fra 5000  $\mu\text{M}$  overføres deretter til en 97  $\mu\text{L}$  acetonitrilbufferblanding (50/50). Sluttkonsentrasjonsområdet er fra 2,5 til 150  $\mu\text{M}$ .

Platen forsegles med forseglingsmatter (MA96RD-04S, [www.kinesis.co.uk](http://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 molekylet.

Prøvene analyseres på LCMS med en strømningsrate på 1 mL/min. Løsningsmiddel A er 15 mM ammoniakk, og løsningsmiddel B er acetonitril. Prøven kjøres under positiv ionespray på en XBridge C18 3,5  $\mu\text{M}$  (2,1 x 30 mm) kolonne fra Waters. Løsningsmiddelgradienten har en total gjennomkjøringstid på 2 minutter, og strekker seg fra 5 % B til 95 % B.

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

Solubilitetsverdier er rapportert i  $\mu\text{M}$  eller  $\mu\text{g/mL}$ .

30

#### *Eksempel 4.2 Vandig solubilitet*

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 romtemperatur tilsettes.

35

Sluttkonsentrasjonen strekker seg fra 200  $\mu\text{M}$  til 2,5  $\mu\text{M}$  i 5 like fortynningstrinn. Den endelige DMSO-konsentrasjonen overskred ikke 2 %. 200  $\mu\text{M}$  pyren tilsettes til hjørnepunktene i hver 96-brønns plate, og tjener som et referansepunkt for kalibrering av X-aksen på mikroskopet.

5

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

10

Solubilitetsverdier er rapportert i  $\mu\text{g/mL}$ .

15

#### *Eksempel 4.3 Plasmaproteinbinding (likevektsanalyse)*

En 10 mM stamoppløsning av forbindelsen i DMSO fortynnes med en faktor 5 i DMSO. Denne oppløsning fortynnes videre i nylig tint humant, rotte, mus eller hundeplasma (BioReclamation INC) med en sluttkonsentrasjon på 10  $\mu\text{M}$ , og endelig DMSO-konsentrasjon på 0,5 % (5,5  $\mu\text{l}$  i 1094,5  $\mu\text{l}$  plasma i en PP-Masterblock 96-brønn (Greiner, kat. nr. 780285).

20

En Pierce Red Device plate med innlegg (ThermoScientific, kat. nr. 89809) fremstilles og fylles med 750  $\mu\text{l}$  PBS i bufferkammeret, og 500  $\mu\text{L}$  av det anrikede plasma i plasmakammeret. Platen inkuberes i 4 timer ved 37°C under rysting ved 230 rpm. Etter inkubasjon overføres 120  $\mu\text{L}$  av begge kamre til 360  $\mu\text{L}$  acetonitril i en 96-brønns rundbunnet, PP-dypbrønnsplate (Nunc, kat. nr. 278743) og forsegles med et lokk av aluminiumsfolie. Prøvene blandes og plasseres på is i 30 minutter. Denne platen sentrifugeres i 30 minutter ved 1200 rcf ved 4°C, og supernatanten overføres til en 96 v-bunn PP-plate (Greiner, 651201) for analyse på LCMS.

25

30

Platen forsegles med forseglingsmatter (MA96RD-04S) av [www.kinesis.co.uk](http://www.kinesis.co.uk), og prøver måles ved romtemperatur på LCMS (ZQ 1525 fra Waters) under optimalisert betingelse ved å anvende Quanoptimize for å bestemme den passende massen til molekylet.

35

Prøvene analyseres på LCMS med en strømningsrate på 1 mL/min. Løsningsmiddel A var 15 mM ammoniakk og løsningsmiddel B var acetonitril. Prøven ble kjørt under

positiv ionespray på en XBridge C18 3,5  $\mu$ M (2,1 x 30 mm) kolonne fra Waters. Løsningsmiddelgradienten har en total gjennomkjøringstid på 2 minutter, og strekker seg fra 5 % B til 95 % B.

- 5 Toppareal fra forbindelsen i bufferkammeret og plasmakammeret betraktes til å være 100 % forbindelse. Prosentandelen bundet til plasma er avledet fra disse resultater, og ble rapportert til LIMS som prosentandel bundet til plasma.

- 10 Solubiliteten av forbindelsen i den endelige testkonsentrasjon i PBS undersøkes ved hjelp av mikroskop for å indikere om presipitering observeres eller ikke.

#### *Eksempel 4.4 Tilbøyelighet for QT-prolongering*

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

##### 15 *4.4.1 Konvensjonell helcelle "patch-clamp"*

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 M $\Omega$  og kompensert ved mer enn 60 %, ble avlesninger ikke lekkasjesubtrahert. Elektroder er produsert fra GC150TF pipetteglass (Harvard).

20

Den eksterne badoppløsning inneholder: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glukose, 10 mM HEPES, pH 7,4.

25

Den interne "patch" pipetteoppløsning inneholder: 100 mM K glukonat, 20 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, 2 mM glutation, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2.

30

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

35

Alle registreringer ble utført på HEK293-celler som stabilt uttrykker hERG-kanaler. Celler dyrkes på 12 mm runde dekkglass (German glass, Bellco) festet i registreringskammeret ved å anvende to platinastaver (Goodfellow). hERG-strømmer ble fremkalt ved å anvende en aktiverende puls til +40 mV for 1000 ms etterfulgt av en sluttstrømpuls til -50 mV i 200 ms, holdepotensialet var -80 mV. Pulser ble påført hvert 20. sekund, og alle forsøk gjennomføres ved romtemperatur.

#### 4.4.2 Dataanalyser

IC<sub>50</sub>- og IC<sub>20</sub>-verdier beregnes for hver testet forbindelse. Ganger forskjell mellom IC<sub>20</sub> og de ubundne C<sub>max</sub>-konsentrasjoner for testforbindelsen oppnådd ved relevante terapeutiske doser som bestemt ved resultater oppnådd fra rotte CIA-modellen  
5 beregnes.

For konsentrasjons-respons kurver, ble toppsluttstrømamplitude målt under spenningstrinnet til -50 mV. Kurvetilpasning av konsentrasjons-respons-data gjennomføres ved å anvende likningen:  
10

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

hvor a er minimumsresponsen, b er maksimumsresponsen og d er Hill-slope, hvor denne likning kan anvendes for å beregne både IC<sub>50</sub> (hvor y = 50 og c er IC<sub>50</sub>-verdien)  
15 og IC<sub>20</sub> (hvor y = 20 og c er IC<sub>20</sub>-verdien). GraphPad® Prism® (Graphpad® Software Inc.) software ble anvendt for all kurvetilpasning. En forskjell på 100 ganger eller større indikerer et lavt potensial for QT-forlengelse.

#### Eksempel 4.5 Mikrosomal stabilitet

20 En 10 mM stamoppløsning av forbindelse i DMSO ble fortynnet 1000 ganger i en 182 mM fosfatbuffer pH 7,4 i en 96 dypbrønns plate (Greiner, kat. nr. 780285) og ble pre-inkubert ved 37°C.

40 µL deionisert vann ble tilsatt til en brønn i et polypropylenmatriks 2D  
25 strekkodemerket lagringsrør (Thermo Scientific) og ble pre-inkubert ved 37°C.

En glukose-6-fosfat-dehydrogenase (G6PDH) arbeids-stamoppløsning ble fremstilt i 182 mM fosfatbuffer pH 7,4, og ble plassert på is før bruk. En ko-faktor inneholdende MgCl<sub>2</sub>, glukose-6-fosfat og NADP<sup>+</sup> ble fremstilt i deionisert vann, og ble plassert på is  
30 før bruk.

En endelig arbeidsoppløsning inneholdende levermikrosomer (Xenotech) av en art av interesse (menneske, mus, rotte, hund), tidligere beskrevet G6PDH og ko-faktorer, ble fremstilt, og denne blanding ble inkubert i høyst 20 minutter ved romtemperatur.  
35

30 µL av den forvarmede forbindelsesfortynning ble tilsatt til 40 µL forvarmet vann i matriksrør og 30 µL av mikrosomal blanding ble tilsatt. Endelige

reaksjonskonsentrasjoner var 3  $\mu$ M forbindelse, 1 mg mikrosomer, 0,4 U/mL GDPDH, 3,3 mM  $MgCl_2$ , 3,3 mM glukose-6-fosfat og 1,3 mM NADP+.

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

10 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).

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

Disse platene ble forseglest med forseglingsmatter (MA96RD-04S) fra [www.kinesis.co.uk](http://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.

25 Prøvene ble analysert på LCMS med en strømningsrate 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 ionespray på en XBridge C18 3,5  $\mu$ M (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.

30 Toppareal fra moderforbindelsen på tid 0 ble betraktet til å være 100 % gjenværende. Prosentandel gjenværende etter 1 times inkubasjon ble beregnet fra tid 0, og ble beregnet som prosentandel gjenværende. Oppløseligheten av forbindelsen i den endelige testkonsentrasjon i buffer inspiseres ved mikroskop og resultatene rapporteres.

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

**Tabell IX – mikrosomal stabilitet**

| Forbindelse # | Human    | Rotte    |
|---------------|----------|----------|
| 1             | 76-100 % | 76-100 % |

*Eksempel 4.6 Caco2-permeabilitet*

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

10  $2 \times 10^5$  celler/brønn ble utsådd i utsåingsmedium bestående av DMEM + GlutaMAXI + 1 % NEAA + 10 % FBS (FetalClone II) + 1 % Pen/Strep. Mediet ble forandret hver andre til tredje dag.

15 Testforbindelser og referanseforbindelser (propanol og rhodamin123 eller vinblastin, alle innkjøpt fra Sigma) ble fremstilt i Hanks balanserte saltoppløsningsmiddel som inneholdt 25 mM HEPES (pH 7,4) og ble tilsatt til enten de apikale (125  $\mu$ L) eller basolaterale (600  $\mu$ L) kamre i Transwell-platesammenstillingen, ved en konsentrasjon på 10  $\mu$ M med en endelig DMSO-konsentrasjon på 0,25 %.

20 50  $\mu$ M Lucifer Yellow (Sigma) ble tilsatt til donorbufferen i alle brønner for å fastslå integritet av cellelagene ved å måle Lucifer Yellow permeasjon. Da Lucifer Yellow (LY) ikke fritt kan permeere lipofile barrierer, indikerer en høy grad av LY-transport dårlig integritet av cellelaget.

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

30 Lucifer yellow ble målt med en Spectramax Gemini XS (Ex 429 nm og Em 538 nm) i en ren 96-brønns plate som inneholdt 150  $\mu$ L væske fra basolateral og apikal side.

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

35 Tilsynelatende permeabilitet ( $P_{app}$ )-verdier ble beregnet fra sammenhengen:

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

$V$  = kammervolum

5  $T_{inc}$  = inkubasjonstid.

Overflateareal =  $0,33 \text{ cm}^2$

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

10

De etterfølgende analyseakseptanskriterier ble anvendt:

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

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

15

Lucifer yellow permeabilitet:  $\leq 100$  nm/s

**Tabell X – Caco2 effluksrate**

| Forbindelse nr. | $P_{app} A > B$ ( $\times 10^{-6}$<br>cm/sek.) | Effluksforhold |
|-----------------|------------------------------------------------|----------------|
| 1               | $7,8 \pm 0,8$                                  | $6,1 \pm 0,6$  |

20

#### *Eksempel 4.7 Farmakokinetikkstudie*

##### *4.7.1 Farmakokinetikkstudie i gnagere*

Forbindelser formuleres i PEG200/fysiologisk salt- eller PEG400/DMSO/fysiologisk  
 saltvannblanding for intravenøs rute og i 0,5 % metylcellulose eller 10-30 %

hydroksypropyl- $\beta$ -syklodekstrin pH 3 eller pH 7,4 for den orale ruten. Testforbindelser

25

doseres oralt som en enkel øsofagus-sondefôring med 5-10 mg/kg, og ble dosert

intravenøst som en bolus via kaudalvenen ved 1 mg/kg. Hver gruppe består av tre

rotter. Blodprøver samles enten ved jugularvenen ved å anvende rotter utstyrt med

kanyler, eller i retroorbital sinus med litiumheparin som anti-koagulasjonsmiddel på

tidspunktene i det etterfølgende området: 0,05 til 8 timer (intravenøs rute), og 0,25 til

30

6 eller 24 timer (oral rute). Prøver av fullblod sentrifugeres ved 5000 rpm i 10

minutter, og de oppnådde plasmaprøver lagres ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i påvente av analyse.

##### *4.7.2 Farmakokinetikkstudie i hunder*

Forbindelser formuleres i PEG200/fysiologisk saltvannsblandinger for den intravenøse rute, og i 0,5 % metylcellulose eller PEG400/hydroksypropyl- $\beta$ -syklodekstrinblandinger surgjort med sitronsyre til pH 2-3 for den orale rute.

Testforbindelser doseres oralt via sondefôring ved 5-30 mg/kg, og doseres intravenøst med en bolus eller en 10 minutter infusjon via kefalvenen ved 1 mg/kg. Hver gruppe består av tre hann eller tre hunn Beagle hunder. Blodprøver samles via jugularvenen med litiumheparin som anti-koagulasjonsmiddel på tidspunktene mellom 0,083 til 24 timer etter dosering. Blodprøver av fullblod sentrifugeres ved 5000 rpm i 10 minutter, og de resulterende plasmaprøver lagres ved -20°C i påvente av analyse.

#### 4.7.3 Kvantifisering av forbindelsesnivåer i plasma

Plasmakonsentrasjoner for hver testforbindelse bestemmes ved en LC-MS/MS-metode, hvor massespektrometeret opereres i positiv elektrospraymodus.

#### 4.7.4 Bestemmelse av farmakokinetikkparametere

Farmakokinetikkparametere beregnes ved å anvende Winnonlin® (Pharsight®, United).

#### Eksempel 4.8 7-dagers rottetoksisitetsstudie

En 7-dagers oral toksisitetsstudie med testforbindelser gjennomføres 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.

Testforbindelsene er formulert i 30 % (volum/volum) HP $\beta$ CD i rensset vann. Hver gruppe inkluderer 5 viktige hannrotter så vel som 3 satellittdyr for toksikokinetikker. En fjerde gruppe ble gitt 30 % (volum/volum) HP $\beta$ CD i kun vann, ved den samme frekvens, doseringsvolum og ved den samme administreringsruten, og virker som vehikkelkontrollgruppen.

Målet for studien er å bestemme den laveste dosen som resulterer i at ingen bivirkninger blir identifisert ("no observable adverse effect level" – NOAEL).

#### Eksempel 4.9 Hepatocytstabilitet

Modeller for å evaluere metabolsk clearance i hepatocyt er beskrevet av McGinnity et al. Drug Metabolism and Disposition **2008**, 32, 11, 1247.

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

## REFERANSER

- 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.
- 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.
- Constantinescu et al., 2007, *Trends in Biochemical Sciences* 33(3): 122-131.
- Firestein GS. (2003). *Nature*. 423:356-61.
- Geron *et al.* (2008) Selective inhibition of JAK2-driven erythroid differentiation of polycythemia vera progenitors *Cancer Cell* 13 (4), 321-30.
- 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. Immunol*, 162-172.
- Jou IM, Shiao 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.
- Kachigian LM. (2006) Collagen antibody-induced arthritis, *Nature Protocols* 2512-2516.
- Khachigian, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. (2006) *Nature Protocols* 1, 2512-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Willmane CL; (2009) JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia, PNAS May 22. [Epub ahead of print].
- Nials *et al.* (2008) Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge, Disease Models & Mechanisms, 213-220.
- Nishida K, Komiyama 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.
- O'Shea, J.J., Pesu, M., Borie, D.C., Changelian, P.S., Nature Reviews, 2004, 555-564.
- 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.
- Pernis *et al.* (2002) JAK-STAT signaling in asthma J. Clin. Invest. 1279.
- Rall LC, Roubenoff R. (2004) Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. Rheumatology; 10:1219-23.
- 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.
- 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 *et al.*, (2004) Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis, Arthritis Rheum. 50 2338-2346.
- Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht 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.
- Smolen JS, Steiner G. (2003). Nat Rev Drug Discov. 2: 473-88.

Tam, L., McGlynn, L.M., Traynor, P., Mukherjee, R., Bartlett, J.M.S., Edwards, J. (2007) *British Journal of Cancer*, 97, 378-383.

Tetsuji Naka, Norihiro Nishimoto and Tadamitsu Kishimoto, *Arthritis Res* 2002, 4 (suppl 3):S233-S242.

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.

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.

Wieland 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*, 1073-1083.

McGinnity, D.F. (2004) Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as *in vitro* drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 11, 1247.

Alle publikasjoner som inkluderer, men som ikke er begrenset til, patenter og patentsøknader som er omtalt i beskrivelsen her, er innlemmet ved referanse som  
5 hver individuelle publikasjon var spesifikt og individuelt indikert til å være innlemmet her ved referanse som om den er angitt fullstendig.

Fra den foregående beskrivelse vil forskjellige modifikasjoner og forandringer i sammensetninger og metoder ifølge denne oppfinnelse fremgå for de fagkyndige på  
10 området. Alle slike modifikasjoner faller innenfor rammen av de vedlagte krav og skal være inkludert heri.

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

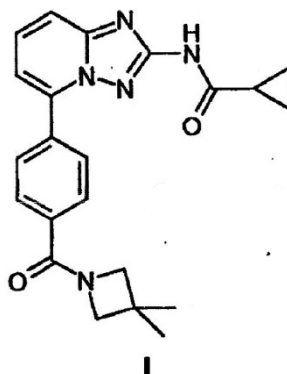
De kjemiske navn til forbindelsen ifølge oppfinnelsen som gitt og fremsatt i denne søknad, kan ha vært dannet på en automatisert basis ved bruk av et kommersielt tilgjengelig kjemisk software-program for navngivelse, og er ikke verifisert uavhengig.  
20 Representative programmer som gjennomfører denne funksjon inkluderer Lexichem navngivningsverktøyet solgt av Open Eye Software, Inc. og Autonom Software verktøyet solgt av MDL, Inc. I det tilfellet hvor det identiske kjemiske navn og den angitte struktur avviker, vil den angitte struktur være den som styrer.

Kjemiske strukturer som vist her ble fremstilt ved anvendelse av enten ChemDraw® eller ISIS®/DRAW. En hvilken som helst åpen valens som fremgår på et karbonatom,  
25

oksygenatom eller nitrogen i strukturen her indikerer tilstedeværelsen av et hydrogenatom. Der hvor et chiralt senter eksisterer i en struktur, men hvor ingen spesifikk stereokjemi er vist for det chirale senter, er begge enantiomerer assosiert med den chirale struktur omfattet av strukturen.

## PATENTKRAV

1. Forbindelse ifølge formel I:



eller et farmasøytisk aksepterbart salt derav.

2. Forbindelse ifølge krav 1, som er i form av en fri base.

3. Farmasøytisk preparat som omfatter en farmasøytisk aksepterbart bærer og en farmasøytisk effektiv mengde av en forbindelse eller et farmasøytisk aksepterbart salt ifølge krav 1 eller 2.

4. Farmasøytisk preparat ifølge krav 3, for oral administrering.

5. Farmasøytisk preparat ifølge krav 3, for injiserbar administrering.

6. Farmasøytisk preparat ifølge krav 3, for topisk administrering.

7. Farmasøytisk preparat ifølge hvilke som helst av kravene 3 til 6, som omfatter et ytterligere terapeutisk middel.

8. Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav ifølge krav 1 eller 2, for anvendelse som et medikament.

9. Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav ifølge krav 1 eller 2, for anvendelse i behandling, forebygging eller profylakse av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale

bruskmisdannelser, Castlemans sykdom, multippel myelom, psoriasis, Kaposis sarkom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.

10.     Anvendelse av en forbindelse eller et farmasøytisk aksepterbart salt derav  
5 ifølge krav 1 eller 2, for fremstilling av et medikament for behandling, forebygging eller profylakse av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale bruskmisdannelser, Castlemans sykdom, multippel myelom, psoriasis, Kaposis sarkom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.
- 10
11.     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 9, for behandling, forebygging eller profylakse av en inflammatorisk tilstand.
12.     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge  
15 krav 11, hvor den inflammatoriske tilstand er reumatoid artritt.
13.     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 9, for behandling, forebygging eller profylakse av systemisk lupus erytematosus.
- 20
14.     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 9, for behandling, forebygging eller profylakse av psoriasis.
15.     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 8, hvor forbindelsen eller farmasøytisk aksepterbart salt derav ifølge krav 1 eller  
25 2 administreres i kombinasjon med et ytterligere terapeutisk middel.
16.     Farmasøytisk preparat ifølge krav 7, hvor det ytterligere terapeutiske middel er et middel for behandling, forebygging eller profylakse av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning,  
30 sykdommer som involverer svekkelse av brusk-turnover, kongenitale bruskmisdannelser, Castlemans sykdom, multippel myelom, psoriasis, Kaposis sarkom eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.
- 17,     Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge  
35 krav 15, hvor det ytterligere terapeutiske middel er et middel for behandling eller forebygging av inflammatoriske tilstander, autoimmune sykdommer, proliferative sykdommer, transplantatavstøtning, sykdommer som involverer svekkelse av brusk-

turnover, kongenitale brusk misdannelser, Castlemans sykdom, multippel myelom, psoriasis, Kaposi sarkom, eller mesangial proliferativ glomerulonefritt.

5 18. Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 15, hvor forbindelsen eller det farmasøytisk aksepterbare salt derav ko-administreres med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av systemisk lupus erytematosus.

10 19. Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 15, hvor forbindelsen eller farmasøytisk aksepterbart salt derav ko-administreres med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av psoriasis.

15 20. Forbindelse eller farmasøytisk aksepterbart salt derav for anvendelse ifølge krav 15, hvor forbindelsen eller det farmasøytisk aksepterbare salt derav ko-administreres med et annet terapeutisk middel for behandling og/eller forebygging av reumatoid artritt.