

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7096268号
(P7096268)

(45)発行日 令和4年7月5日(2022.7.5)

(24)登録日 令和4年6月27日(2022.6.27)

(51)国際特許分類

C 0 7 D 471/04 (2006.01)	F I	C 0 7 D 471/04	1 0 7 Z
A 6 1 K 31/4545(2006.01)		A 6 1 K 31/4545	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)		A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 11/06	

請求項の数 23 (全42頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-559304(P2019-559304)

(86)(22)出願日 平成30年4月30日(2018.4.30)

(65)公表番号 特表2020-518582(P2020-518582
A)

(43)公表日 令和2年6月25日(2020.6.25)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/030144

(87)国際公開番号 WO2018/204236

(87)国際公開日 平成30年11月8日(2018.11.8)

審査請求日 令和3年3月26日(2021.3.26)

(31)優先権主張番号 62/492,571

(32)優先日 平成29年5月1日(2017.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(73)特許権者 514190040

セラヴァンス バイオファーマ アール&
ディー アイピー, エルエルシー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
80, サウス サンフランシスコ, ゲ
ートウェイ ブールバード 901

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 JAK阻害剤化合物の結晶形態

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物。

【請求項2】

前記結晶性水和物が、 6 . 7 7 ± 0 . 2 0 、 1 2 . 1 3 ± 0 . 2 0 、 1 3 . 5 4 ± 0 . 2 0 、 1 7 . 2 3 ± 0 . 2 0 、 および 1 8 . 0 0 ± 0 . 2 0 の 2 値における回折ピークを含む粉末X線回折パターンを特徴とする、請求項1に記載の結晶性水和物。

【請求項3】

前記粉末X線回折パターンが、 1 1 . 5 6 ± 0 . 2 0 、 1 4 . 2 9 ± 0 . 2 0 、 1 9 . 5 1 ± 0 . 2 0 、 2 1 . 3 8 ± 0 . 2 0 、 および 2 3 . 6 3 ± 0 . 2 0 から選択される、 2 値における 2 つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有することをさらに特徴とする、請求項2に記載の結晶性水和物。

【請求項4】

前記結晶性水和物が、 2 6 6 ~ 2 7 6 の温度で吸熱熱流の最大値を示す、 1 0 / 分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定トレースを特徴とする、請求項1に記載の結晶性水和物。

【請求項5】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4

, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物。

【請求項 6】

前記結晶性水和物が、4.81 ± 0.20、9.66 ± 0.20、14.93 ± 0.20、および16.78 ± 0.20の2値における回折ピークを含む粉末X線回折パターンを特徴とする、請求項5に記載の結晶性水和物。

【請求項 7】

前記粉末X線回折パターンが、10.46 ± 0.20、16.21 ± 0.20、17.45 ± 0.20、22.87 ± 0.20、および24.77 ± 0.20から選択される、2値における2つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有することをさらに特徴とする、請求項6に記載の結晶性水和物。

10

【請求項 8】

前記結晶性水和物が、180 ~ 190 の温度で吸熱熱流の最大値を示す、10 / 分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定トレースを特徴とする、請求項5に記載の結晶性水和物。

【請求項 9】

請求項1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物と薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 10】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物を調製する方法であって、前記方法が、

20

(a) 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノール：シュウ酸の等モル混合物をテトラヒドロフラン：水の体積で1 : 1 混合物に室温で溶解させることと、

(b) テトラヒドロフラン：水：アセトニトリルの体積で1 : 1 : 2 混合物を添加して懸濁液を生成すること、

(c) 前記懸濁液を約1日間攪拌することと、

30

(d) 前記懸濁液から前記シュウ酸塩の前記結晶性水和物を単離することを含む、方法。

【請求項 11】

哺乳動物において呼吸器疾患を処置するための医薬組成物であって、請求項1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物と薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 12】

前記呼吸器疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、囊胞性線維症、間質性肺炎、特発性肺線維症、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症候群、気管支炎、気腫または閉塞性細気管支炎である、請求項11に記載の医薬組成物。

40

【請求項 13】

前記呼吸器疾患が閉塞性細気管支炎である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記呼吸器疾患が喘息または慢性閉塞性肺疾患である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記呼吸器疾患が喘息である、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記医薬組成物が吸入によって投与される、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記呼吸器疾患が、肺感染症、蠕虫感染症、肺動脈性肺高血圧症、サルコイドーシス、リ

50

ンパ脈管筋腫症、気管支拡張症、または浸潤性肺疾患である、請求項1_1に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記呼吸器疾患が、薬物誘導性間質性肺炎、真菌誘導性間質性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、特発性急性好酸球性肺炎、特発性慢性好酸球性肺炎、好酸球増加症状群、レフレル症状群、閉塞性細気管支炎性器質化肺炎、または免疫チェックポイント阻害剤誘発性間質性肺炎である、請求項1_1に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

哺乳動物における呼吸器疾患の処置において使用するための、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項 5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物を含む、組成物。

10

【請求項 20】

哺乳動物における呼吸器疾患の処置のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項 5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物の使用。

【請求項 21】

哺乳動物において眼疾患を処置するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項 5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物と薬学的に許容され得る担体とを含み、前記医薬組成物が前記哺乳動物の眼に投与されることを特徴とする、医薬組成物。

20

【請求項 22】

哺乳動物における眼疾患の処置において使用するための、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項 5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物を含む、組成物。

【請求項 23】

哺乳動物における眼疾患の処置のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 4のいずれか一項に記載の結晶性水和物または請求項 5 ~ 8のいずれか一項に記載の結晶性水和物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

発明の分野

本発明は、呼吸器疾患およびその他の疾患を処置するために有用な JAK 阻害剤化合物の結晶塩形態に向けられる。本発明はまた、そのような化合物を含む医薬組成物、該塩形態を例えば呼吸器疾患および眼疾患を処置するために使用する方法、ならびにそのような結晶塩形態を調製するために有用なプロセスおよび中間体にも関する。

【背景技術】

【0002】

技術水準

サイトカインは、細胞間シグナル伝達分子であり、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、および腫瘍壞死因子がそれに含まれる。サイトカインは正常な細胞増殖および免疫調節に非常に重要であるが、免疫介在性疾患を促進し、悪性細胞の成長の一因にもなる。多くのサイトカインのレベルの上昇は、多数の疾患または状態、特に炎症を特徴とする疾患の病理に関係づけられてきた。疾患に関わるサイトカインの多くは、チロシンキナーゼのヤヌスファミリー (JAK) に依存するシグナル伝達経路によって作用し、それはシグナル伝達性転写因子 (STAT) ファミリーの転写因子を通じてシグナルを伝達する。

40

【0003】

JAK ファミリーは、4 つのメンバー、JAK1、JAK2、JAK3、およびチロシンキナーゼ 2 (TYK2) を含む。サイトカインと JAK 依存性サイトカイン受容体の結合

50

は受容体二量体化を誘導し、それにより JAK キナーゼのチロシン残基がリン酸化され、 JAK 活性化がもたらされる。次に、リン酸化された JAK は、様々な STAT タンパク質に結合してリン酸化し、そのタンパク質が二量体化し、細胞核内に取り込まれ、遺伝子転写を直接調節し、他の作用の中でも、炎症性疾患に関連する下流の作用をもたらす。 JAK は通常、ホモ二量体またはヘテロ二量体としてサイトカイン受容体と対で会合する。特定のサイトカインは特定の JAK 対形成に関連している。 JAK ファミリーの 4 つのメンバーの各々が、炎症に関連するサイトカインの少なくとも 1 つのシグナル伝達に関わっている。

【 0 0 0 4 】

喘息は、予防法または治療法が存在しない気道の慢性疾患である。この疾患は、その全てが気流制限の一因である、気道の炎症、線維症、応答性亢進およびリモデリングを特徴とする。世界中で推定 3 億人が喘息に罹患しており、喘息を有する人の数は、 2025 年までに 1 億人超増加すると推定されている。ほとんどの患者は、ロイコトリエン修飾因子および / また長時間作用型 アゴニストと併用され得る吸入コルチコステロイドの使用によって喘息症状の制御を達成することができるが、その疾患が従来の治療法によって制御されない、重度の喘息を有する患者のサブセットがまだある。 JAK - STAT 経路を通じてシグナルを伝達する、喘息炎症に関わるサイトカインには、 IL - 2 、 IL - 3 、 IL - 4 、 IL - 5 、 IL - 6 、 IL - 9 、 IL - 11 、 IL - 13 、 IL - 23 、 IL - 31 、 IL - 27 、胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP) 、インターフェロン - (IFN) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が含まれる。気道の炎症は、喘息に加えてその他の呼吸器疾患の特徴である。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 、囊胞性線維症 (CF) 、間質性肺炎、間質性肺疾患 (特発性肺線維症を含む) 、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症状群、気管支炎、気腫、および閉塞性細気管支炎も気道疾患であり、その病態生理学は、 JAK シグナル伝達サイトカインに関係していると考えられている。

【 0 0 0 5 】

炎症は、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、ドライアイ病、加齢性黄斑変性、アトピー性角結膜炎をはじめとする多くの眼疾患で顕著な役割を果たす。ブドウ膜炎は複数の眼内炎症状態を包含し、多くの場合、自己免疫性であり、既知の感染性の引き金がなくても生じる。この状態は、米国で約 200 万人の患者に発症すると推定されている。一部の患者では、ブドウ膜炎に関連する慢性炎症が組織破壊を引き起こし、米国ではこれは失明の主な原因の第 5 位である。 JAK - STAT 経路を通じてシグナルを伝達するブドウ膜炎患者の目において増加したサイトカインには、 IL - 2 、 IL - 4 、 IL - 5 、 IL - 6 、 IL - 10 、 IL - 23 、および IFN - が含まれる。 (Horai and Caspi, J Interferon Cytokine Res, 2011, 31, 733 - 744 ; Ooiら, Clinical Medicine and Research, 2006, 4, 294 - 309) 。ブドウ膜炎の既存の治療法は最適でない場合が多く、多くの患者は十分に制御されていない。ステロイドは、効果的な場合もあるが、白内障および眼圧上昇 / 緑内障に関連している。

【 0 0 0 6 】

糖尿病性網膜症 (DR) は、網膜内の血管への損傷によって起こる。それは糖尿病を持つ人の中で視力喪失の最も一般的な原因である。血管新生および炎症経路は、疾患において重要な役割を果たす。多くの場合、 DR は糖尿病の患者の失明の最もよくある原因である糖尿病性黄斑浮腫 (DME) に進行する。この状態は、米国だけで約 150 万人の患者に発症し、そのうち約 20 % が両目に影響を及ぼす疾患有すると推定されている。 JAK - STAT 経路を通じてシグナルを伝達するサイトカイン、例えば IL - 6 など、ならびにその産生が JAK - STAT 経路シグナル伝達によって一部促進されるその他のサイトカイン、例えば IP - 10 および MCP - 1 (または CCL2 と呼ばれる) などは、 DR / DME に関連する炎症において役割を果たすと考えられている (Abcouwer, J Clin Cell Immunol, 2013, Suppl 1, 1 - 12 ; Sohn ら

10

20

30

40

50

、American Journal of Ophthalmology, 2011, 152, 686-694; Owen and Hartnett, Curr Diab Rep, 2013, 13, 476-480; Cheungら、Molecular Vision, 2012, 18, 830-837; Dongら、Molecular Vision, 2013, 19, 1734-1746; Funatsuら、Ophthalmology, 2009, 116, 73-79)。DMEの既存の治療法はしばしば最適ではない：硝子体内抗VEGF処置が一部の患者で唯一有効であり、ステロイドは白内障および眼圧上昇に関連している。

【0007】

ドライアイ疾患（DED）は、米国で約5百万人の患者に発症する多因子障害である。眼表面の炎症は、この疾患の発症および伝播に重要な役割を果たすと考えられている。IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、およびIFN-などのサイトカインのレベルの上昇は、DEDの患者の眼液に認められている。（Stevensonら、Arch Ophthalmol, 2012, 130, 90-100）、そしてこれらのレベルは疾患の重傷度と関連する場合が多い。加齢黄斑変性およびアトピー性角結膜炎も、JAK依存性サイトカインに関連していると考えられている。

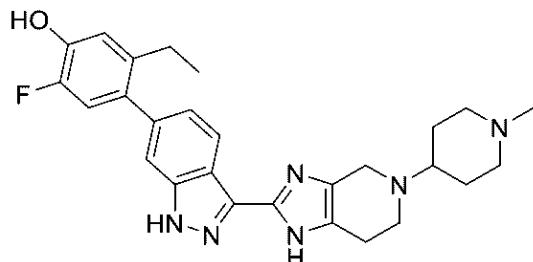
10

【0008】

2016年11月02日に出願された、本発明の譲受人に譲渡された米国特許出願第15/341,226号は、JAK阻害剤として有用なジアミノ化合物を開示している。特に、化合物5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノール（化合物1）

20

【化1】



30

1

は、当該出願において強力な汎JAK阻害剤として具体的に開示されている。

【0009】

この化合物を治療薬として効果的に使用するために、結晶性の固体塩形態を有することが望ましいであろう。例えば、適度に高い温度で熱的に安定し、それにより材料の処理と保存を容易にする物理的形態を有することが非常に望ましいであろう。製造された製品の純度および安定性を高めるために、結晶性固体は一般に非晶形よりも好ましい。しかし、有機化合物の結晶形態の形成は、全く予測不能である。もしもあるならば、有機化合物のどの形態が結晶性になるかを予測するための信頼できる方法は存在しない。さらに、もしもあるならば、どの結晶形態が医薬品としての使用に望ましい物理的特性を有するかを予測する方法も存在しない。

40

【0010】

化合物1の結晶塩形態は以前に報告されていない。したがって、化合物1の結晶塩形態が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【文献】Abcouwer, J Clin Cell Immunol, 2013, Sup

50

p 1 1 , 1 - 1 2
 Sohnら、American Journal of Ophthalmology, 2011, 152, 686 - 694
 Owen and Hartnett, Curr Diab Rep, 2013, 13, 476 - 480
 Cheungら、Molecular Vision, 2012, 18, 830 - 837
 Dongら、Molecular Vision, 2013, 19, 1734 - 1746
 Funatsuら、Ophthalmology, 2009, 116, 73 - 79
 Stevensonら、Arch Ophthalmol, 2012, 130, 90 - 100

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノール (1) のシュウ酸塩およびコハク酸塩の結晶性水和物を提供する。

【0013】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物は、室温で約 30 % ~ 約 90 % の範囲の相対湿度にさらされた場合に、約 266 ~ 約 276 の範囲の融解温度を有し、約 1 % の総吸湿を示すことが見出された。

20

【0014】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物は、室温で約 5 % ~ 約 90 % の範囲の相対湿度にさらされた場合に、約 180 ~ 約 190 の範囲の融解温度を有し、約 2 % の総吸湿を示すことが見出された。

【0015】

他の用途の中でも、本発明の結晶性固体形態は、JAK阻害剤による処置に適した疾患、特に呼吸器疾患を処置または改善するための医薬組成物の調製に有用であると予期される。したがって、その組成物のもう一つの態様において、本発明は、薬学的に許容され得る担体と、5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物および5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物から選択される活性剤とを含む医薬組成物を提供する。

30

【0016】

本発明はまた、哺乳動物において呼吸器疾患、特に喘息を処置する方法も提供し、この方法は、哺乳動物に本発明の結晶性固体形態または医薬組成物を投与することを含む。別個の異なる態様では、本発明は、本発明の結晶形態を調製するために有用な合成プロセスも提供する。

40

【0017】

本発明はさらに、哺乳動物において眼炎症性疾患を処置する方法を提供し、この方法は、哺乳動物の目に本発明の結晶性固体形態または医薬組成物を投与することを含む。

【0018】

本発明はまた、医学療法で使用するための本明細書に記載の本発明の結晶性固体形態、な

50

らびに哺乳動物において呼吸器疾患を処置するための製剤または医薬の製造における本発明の結晶性固体形態の使用も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本発明の様々なる態様は、添付の図面を参照して例示される。

【0020】

【図1】図1は、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物(以降「シュウ酸塩水和物」)の粉末X線回折(PXRD)パターンを示す。

10

【0021】

【図2】図2は、本発明のシュウ酸塩水和物の示差走査熱量測定(DSC)サーモグラムを示す。

【0022】

【図3】図3は、本発明のシュウ酸塩水和物の熱重量分析(TGA)プロットを示す。

【0023】

【図4】図4は、約25℃の温度で観察された本発明のシュウ酸塩水和物の動的水分吸着(DMS)等温線を示す。

【0024】

【図5】図5は、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールの結晶性コハク酸塩水和物(以降「コハク酸塩水和物」)の粉末X線回折(PXRD)パターンを示す。

20

【0025】

【図6】図6は、本発明のコハク酸塩水和物の示差走査熱量測定(DSC)サーモグラムを示す。

【0026】

【図7】図7は、本発明のコハク酸塩水和物の熱重量分析(TGA)プロットを示す。

【0027】

【図8】図8は、約25℃の温度で観察された本発明のコハク酸塩水和物の動的水分吸着(DMS)等温線を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

発明の詳細な説明

定義

様々な態様および実施形態を含む本発明を説明する際、特に明記しない限り、以下の用語は以下の意味を有する。

【0029】

用語「治療上有効な量」とは、処置を必要とする患者に投与されると処置を達成するのに十分な量を意味する。

40

【0030】

用語「処置すること」または「処置」とは、患者(特にヒト)において処置される医学的状態、疾患または障害(例えば、呼吸器疾患)を予防、改善または抑制すること;あるいは、医学的状態、疾患または障害の症状を緩和することを意味する。

【0031】

用語「水和物」とは、水の分子と本発明の化合物とによって形成される、一般に結晶形態の複合体または凝集体を意味し、水分子と化合物分子の比は1:1またはそれ未満であってもよいし1:1またはそれを超えてよい。

【0032】

用語「約」とは、規定値の±5パーセントを意味する。

50

【0033】

本明細書および添付される特許請求の範囲において使用される、単数形の「a」、「an」、「one」および「the」は、内容が明らかに別のものを示している場合を除いて、複数の指示対象を含むことに留意が必要である。

【0034】

命名規則

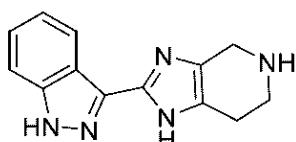
化合物1は、ChemDrawソフトウェア(パーキンエルマー社、マサチューセッツ州ケンブリッジ)で実行されているIUPAC規則に従って5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールと命名される。

10

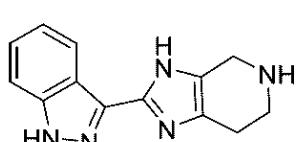
【0035】

さらに、化合物1の構造のテトラヒドロイミダゾピリジン部分のイミダゾ部分は互変異性型で存在し、実施例1の化合物の断片について下に例示されている。

【化2】



A



B

20

【0036】

IUPAC規則によれば、これらの表現は、イミダゾール部分の原子の異なる番号付けを生じる: 2-(1H-インダゾール-3-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン(構造A)に対して2-(1H-インダゾール-3-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-3H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン(構造B)。構造が特定の形態で示されているか、または命名されているとしても、本発明がその互変異性体も含むことは当然理解される。

【0037】

30

本発明の結晶形態

一態様では、本発明は、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノール(1)のシュウ酸塩の結晶性水和物を提供する。

【0038】

一態様では、結晶性シュウ酸塩水和物は、いくつかあるピークのうちで、6.77±0.20、12.13±0.20、13.54±0.20、17.23±0.20、および18.00±0.20の2値における重要な回折ピークを有する粉末X線回折(PXRD)パターンを特徴とする。結晶性シュウ酸塩水和物は、11.56±0.20、14.29±0.20、19.51±0.20、21.38±0.20、および23.63±0.20から選択される2値において3またはそれ以上のさらなる回折ピークを含む、2つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有するPXRDパターンをさらに特徴とすることがある。もう一つの態様では、結晶性シュウ酸塩水和物は、6.77±0.20、11.56±0.20、12.13±0.20、13.54±0.20、14.29±0.20、17.23±0.20、18.00±0.20、19.51±0.20、21.38±0.20、および23.63±0.20の2値における回折ピークを有するPXRDパターンを特徴とする。

40

【0039】

粉末X線回折の分野で周知のように、PXRDスペクトルのピーク位置は、相対ピーク高

50

さよりも、実験の詳細、例えば試料調製および装置のジオメトリの詳細などに対する感受性が比較的低い。したがって、一態様では、結晶性シュウ酸塩水和物は、ピーク位置が図1に示される位置と実質的に一致する粉末X線回折パターンを特徴とする。

【0040】

もう一つの態様では、結晶性シュウ酸塩水和物は、高温にさらされた際の挙動によって特徴付けられる。図2に実証されるように、10/分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定(DSC)トレースは、約59の開始と約97のピークを有する脱溶媒和吸熱と、約268～約273を含む約266～約276の範囲内の融解転移として特定される、吸熱熱流のピークを示す。図3の熱重量分析(TGA)トレースは、約26の温度で脱溶媒和開始および約250の温度で分解開始を示す。総合すると、DSCおよびTGAのトレースは、融解転移が分解を伴うことを示唆している。TGAプロファイルは、約25～約75で約5.5%の重量減少を示す。

10

【0041】

本発明の結晶性シュウ酸塩水和物は、わずかに吸湿性の傾向のある可逆的な吸着/脱着プロファイルを有することが実証された。シュウ酸塩水和物は、図4に示されるように、室温で約30%～約90%の範囲の相対湿度にさらされた場合に、約1%の総吸湿を示した。可逆的な水和/脱水転移は約0%～15%の相対湿度で観察された。ヒステリシスは、2サイクルの吸着および脱着において観察されなかった。

【0042】

もう一つの態様では、本発明は、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物(1)を提供する。

20

【0043】

一態様では、結晶性コハク酸塩水和物は、いくつかあるピークのうちで、4.81±0.20、9.66±0.20、14.93±0.20、および16.78±0.20の2値における重要な回折ピークを有する粉末X線回折(PXRD)パターンを特徴とする。結晶性コハク酸塩水和物は、10.46±0.20、16.21±0.20、17.45±0.20、22.87±0.20、および24.77±0.20から選択される2値において3またはそれ以上のさらなる回折ピークを含む、2つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有するPXRDパターンをさらに特徴とすることがある。もう一つの態様では、結晶性シュウ酸塩水和物は、4.81±0.20、9.66±0.20、10.46±0.20、14.93±0.20、16.21±0.20、16.78±0.20、17.45±0.20、22.87±0.20、および24.77±0.20の2値における回折ピークを有するPXRDパターンを特徴とする。さらにもう一つの態様では、結晶性コハク酸塩水和物は、ピーク位置が図5に示される位置と実質的に一致する粉末X線回折パターンを特徴とする。

30

【0044】

結晶性コハク酸塩水和物も、高温にさらされた際の挙動によって特徴付けられる。図6に実証されるように、10/分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定(DSC)トレースは、2つの脱溶媒和吸熱を示し、1つ目は約20の開始と約50のピークを有し、2つ目の脱溶媒和吸熱は約103の開始と約129のピークを有する。DSCトレースは、約183～約188を含む約180～約190の範囲内の融解転移として特定される吸熱熱流のピークをさらに示す。図7の熱重量分析(TGA)トレースは、約200の温度で分解開始を示す。

40

【0045】

結晶性コハク酸塩水和物は、わずかに吸湿性の傾向のある可逆的な吸着/脱着プロファイルを有することが実証された。コハク酸塩水和物は、図8に示されるように、室温で約5%～約90%の範囲の相対湿度にさらされた場合に、約2%の総吸湿を示した。ヒステリシスは、2サイクルの吸着および脱着において観察されなかった。

50

【0046】

合成手順

化合物1は、以下の実施例に記載の手順を使用して、または本出願の背景の項に列挙される本発明の譲受人に譲渡された米国出願に記載の手順を使用して、容易に入手可能な出発物質から調製することができる。

【0047】

本発明の結晶性シュウ酸塩水和物は、化合物1とシュウ酸の等モル混合物をテトラヒドロフランおよび水の1:1混合物に室温で溶解させ、続いてテトラヒドロフラン:水:アセトニトリルの1:1:2混合物を逆溶剤として添加して懸濁液を生成することによって便宜に調製される。得られる反応混合物を室温で約1日間攪拌し、アセトニトリルで洗浄し、乾燥させて結晶性水和物形態が得られる。

10

【0048】

本発明の結晶性コハク酸塩水和物は、3段階のプロセスによって調製されてよい。第1に、化合物1とコハク酸の等モル混合物をイソプロパノール中に懸濁させ、室温で約1日間攪拌する。得られる固体を濾過し、イソプロパノールで洗浄し、乾燥させて第1の中間体結晶性固体が得られる。第2に、単離した第1の中間体結晶性固体を約150℃で約30分間乾燥させると第2の中間体結晶性固体が得られる。第3に、第2の中間体固体を約80%~90%の相対湿度下、室温で約1日間平衡させると結晶性コハク酸塩水和物形態が得られる。

【0049】

20

一つの方法態様によれば、本発明は、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物を調製する方法を提供し、該方法は、(a)5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノール:シュウ酸の1:1混合物をテトラヒドロフラン:水の1:1混合物に室温で溶解させること、(b)テトラヒドロフラン:水:アセトニトリルの1:1:2混合物を添加して懸濁液を生成すること、(c)懸濁液を約1日間攪拌すること、および(d)結晶性シュウ酸塩水和物を懸濁液から単離することを含む。

30

【0050】

医薬組成物

本発明の結晶性固体形態は、一般に医薬組成物または製剤の形態で使用される。そのような医薬組成物は、吸入によって患者に有利に投与され得る。さらに、医薬組成物は、以下に限定されるものではないが、経口、局所(経皮を含む)、直腸、経鼻、および非経口投与様式を含む、任意の許容可能な投与経路によって投与され得る。

【0051】

40

したがって、その組成物の態様の一つにおいて、本発明は、薬学的に許容され得る担体または賦形剤と、化合物1の結晶性シュウ酸塩水和物または結晶性コハク酸塩水和物とを含む医薬組成物に向けられる。必要に応じて、そのような医薬組成物は、所望により、他の治療薬および/または配合剤を含んでもよい。組成物およびその使用を考察する際、本発明の結晶性固体形態は、本明細書において「活性剤」と呼ばれることがある。

【0052】

本発明の医薬組成物は、一般に治療上有効な量の本発明の結晶形態を含有する。しかし、当業者は、医薬組成物が治療上有効な量より多い量を含有する(すなわちバルク組成物)か、または治療上有効な量よりも少ない量を含有する(すなわち治療上有効な量を達成するため複数回投与用に設計された個々の単位用量)ことができることを理解するであろう。

【0053】

一般に、そのような医薬組成物は、約0.01~約95重量%の活性剤を含む;それには

50

、例えば約0.05～約30重量%；および約0.1%～約10重量%の活性剤が含まれる。

【0054】

任意の従来の担体または賦形剤を本発明の医薬組成物に使用することができる。特定の担体または賦形剤、あるいは担体または賦形剤の組合せの選択は、特定の患者を処置するために使用される投与様式あるいは医学的状態または疾患状態の種類に依存することになる。この点について、特定の投与様式に適した医薬組成物の調製は、十分に製薬分野の当業者の範囲内である。その上、本発明の医薬組成物に使用される担体または賦形剤は、商業的に入手可能である。さらなる例として、従来の製剤技法が、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000)；およびH.C. Anselら、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)に記載されている。

10

【0055】

薬学的に許容され得る担体として役立ち得る材料の代表的な例としては、以下に限定されるものではないが、以下が挙げられる：糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロースなど；デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなど；セルロース、例えば微結晶性セルロース、およびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなど；トラガント末；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えばカカオバターおよび坐剤ワックスなど；油、例えばピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油など；グリコール、例えばプロピレン glycol など；ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレン glycol など；エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなど；寒天；緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど；アルギン酸；パイロジエンフリー水；等張性生理食塩水；リングル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；ならびに医薬組成物中で用いられるその他の無毒の適合物質。

20

【0056】

医薬組成物は、一般に活性剤を薬学的に許容され得る担体および1または複数の随意の構成成分と完全にかつ均質に混合またはブレンドすることによって調製される。結果として得られる均一にブレンドされた混合物は、次に従来の手順および機器を使用して錠剤、カプセル剤、丸剤などに成形または充填ができる。

30

【0057】

一態様では、医薬組成物は吸入投与に適している。吸入投与のための医薬組成物は、一般にエアゾールまたは粉末の形態である。そのような組成物は、通常、吸入器送達装置、例えばドライパウダー式吸入器(DPI)、定量吸入器(MDI)、ネブライザーアクティベーター、または同様の送達装置などを使用して投与される。

40

【0058】

特定の実施形態では、医薬組成物は、ドライパウダー式吸入器を使用して吸入によって投与される。そのようなドライパウダー式吸入器は、一般に、吸気の間に患者の気流に分散する流動性粉末として医薬組成物を投与する。流動性粉末組成物を実現するために、治療薬は一般にラクトース、デンプン、マンニトール、デキストロース、ポリ乳酸(PLA)、ポリラクチド-コ-グリコリド(PLGA)またはその組合せなどの適した賦形剤とともに配合される。一般に、治療薬は、吸入に適した組成物を形成するために微粒子化され、適した担体と組み合わされる。

【0059】

ドライパウダー式吸入器で用いる代表的な医薬組成物は、ラクトースと、微粉化形態の本発明の結晶性固体形態を含む。そのような乾燥粉末組成物は、例えば、乾式粉碎ラクトー

50

スを治療薬と組み合わせた後、成分をドライブレンドすることによって作製することができる。次に、組成物は、一般に、乾燥粉末ディスペンサー、または乾燥粉末送達装置で使用するための吸入カートリッジまたはカプセルに充填される。

【0060】

吸入による治療薬の送達に適したドライパウダー式吸入器送達装置は、当技術分野において記載されており、そのような装置の例は商業的に入手可能である。例えば、代表的なドライパウダー式吸入器送達装置または製品としては、A e o l i z e r (ノバルティス) ; A i r m a x (I V A X) ; C l i c k H a l e r (I n n o v a t a B i o m e d) ; D i s k h a l e r (グラクソスミスクライン) ; D i s k u s / A c c u h a l e r (グラクソスミスクライン) ; E l l i p t a (グラクソスミスクライン) ; E a s y h a l e r (O r i o n P h a r m a) ; E c l i p s e (アベンティス) ; F l o w C a p s (H o v i o n e) ; H a n d i h a l e r (ベーリンガーインゲルハイム) ; P u l v i n a l (C h i e s i) ; R o t a h a l e r (グラクソスミスクライン) ; S k y e H a l e r / C e r t i h a l e r (S k y e P h a r m a) ; T w i s t h a l e r (シエリング・プラウ) ; T u r b u h a l e r (アストラゼネカ) ; U l t r a h a l e r (アベンティス) ; などが挙げられる。

10

【0061】

もう一つの特定の実施形態では、医薬組成物は、定量吸入器を使用して吸入によって投与される。そのような定量吸入器は、一般に、圧縮された高圧ガスを用いて、測定された量の治療薬を放出する。したがって、定量吸入器を使用して投与される医薬組成物は、一般に、治療薬の溶液または懸濁液を液化高圧ガス中に含む。任意の適した液化高圧ガスが用いられてよく、それにはヒドロフルオロアルカン (H F A) 、例えば 1 , 1 , 1 , 2 - テトラフルオロエタン (H F A 1 3 4 a) および 1 , 1 , 1 , 2 , 3 , 3 , 3 - ヘプタフルオロ - n - プロパン、 (H F A 2 2 7) など；ならびにクロロフルオロカーボン、例えば C C l 3 F などが含まれる。特定の実施形態では、高圧ガスはヒドロフルオロアルカンである。一部の実施形態では、ヒドロフルオロアルカン製剤は、共溶媒、例えばエタノールまたはペンタンなど、および / または界面活性剤、例えばソルビタントリオレエート、オレイン酸、レシチン、およびグリセリンなどを含む。

20

【0062】

定量吸入器で用いる代表的な医薬組成物は、約 0 . 0 1 % ~ 約 5 重量 % の本発明化合物；約 0 % ~ 約 2 0 重量 % のエタノール；および約 0 % ~ 約 5 重量 % の界面活性剤を含み；残りは H F A 高圧ガスである。そのような組成物は、一般に、冷却したかまたは加圧したヒドロフルオロアルカンを、治療薬、エタノール (存在する場合) および界面活性剤 (存在する場合) を含有する、適した容器に添加することによって調製される。懸濁液を調製するには、治療薬を微粉化した後、高圧ガスと組み合わせる。次に、一般に定量吸入装置の一部を形成するエアゾール缶に組成物を充填する。

30

【0063】

吸入による治療薬の送達に適した定量吸入装置は、当技術分野において記載されており、そのような装置の例は商業的に入手可能である。例えば、代表的な定量吸入器または製品としては、A e r o B i d I n h a l e r S y s t e m (F o r e s t P h a r m a c e u t i c a l s) ; A t r o v e n t I n h a l a t i o n A e r o s o l (ベーリンガーインゲルハイム) ; F l o v e n t (グラクソスミスクライン) ; M a x a i r I n h a l e r (3 M) ; P r o v e n t i l I n h a l e r (シエリング) ; S e r e v e n t I n h a l a t i o n A e r o s o l (グラクソスミスクライン) ; などが挙げられる。

40

【0064】

もう一つの特定の態様では、医薬組成物は、ネブライザー吸入器を使用する吸入によって投与される。そのようなネブライザー装置は、一般に、患者の気道に運ばれるミストとして医薬組成物を噴霧させる高速の空気の流れを生成する。したがって、ネブライザー吸入器で用いるために配合される場合、治療薬は、溶液を形成するために適した担体に溶解さ

50

せることができる。あるいは、治療薬を微粉化するかまたはナノ粉碎し、適した担体と組み合わせて懸濁液を形成することができる。

【0065】

ネブライザー吸入器で用いる代表的な医薬組成物は、約0.05 µg / mL ~ 約20 mg / mLの本発明の化合物と、噴霧剤に適合する賦形剤を含む溶液または懸濁液を含む。一実施形態では、溶液のpHは約3 ~ 約8である。

【0066】

吸入による治療薬の送達に適したネブライザー装置は、当技術分野において記載されており、そのような装置の例は商業的に入手可能である。例えば、代表的なネブライザー装置または製品としては、Respimat Softmist Inhaler (ベーリングガーベイングルハイム) ; the AERx Pulmonary Delivery System (Aeradigm Corp.) ; the PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH) ; などが挙げられる。

10

【0067】

さらにもう一つの態様では、本発明の医薬組成物は、その代わりに、経口投与を意図した剤形に調製されてよい。経口投与に適した医薬組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、ロゼンジ、カシェ、糖衣錠、粉末、顆粒剤の形態であるか；あるいは、水性または非水性液体の溶液または懸濁液として；あるいは水中油型または油中水型液体エマルジョンとして；あるいはエリキシル剤またはシロップ剤として；などであってよく；それぞれ、所定量の本発明の化合物を有効成分として含有する。

20

【0068】

固体剤形での経口投与を目的とする場合、本発明の医薬組成物は、一般に、活性剤と、1または複数の薬学的に許容され得る担体、例えばクエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムなどを含むことになる。必要に応じて、またはその代わりに、そのような固体剤形は、賦形剤または增量剤、結合剤、保水剤、溶解遅延剤、吸収促進剤、湿潤剤、吸収剤、潤滑剤、着色剤、および緩衝剤を含むこともある。離型剤、湿潤剤、コーティング剤、甘味料、香味料および芳香剤、防腐剤および酸化防止剤も、本発明の医薬組成物に存在し得る。

【0069】

結晶性固体形態は、眼注射用の滅菌水性懸濁液または溶液として配合されてもよい。そのような水性製剤に含めてよい有用な賦形剤としては、ポリソルベート80、カルボキシメチルセルロース、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ヒスチジン、- - -トレハロース二水和物、スクロース、ポリソルベート20、ヒドロキシプロピル - - -シクロデキストリン、およびリン酸ナトリウムが挙げられる。ベンジルアルコールは、防腐剤として役立ち得、塩化ナトリウムは張性を調整するために含まれることがある。さらに、塩酸および/または水酸化ナトリウムが、pH調整のために溶液に添加されてよい。眼注射用の水性製剤は、防腐剤無添加で調製されてよい。

30

【0070】

代替製剤には、制御放出製剤、経口投与用の液体剤形、経皮パッチ、および非経口製剤が含まれてもよい。そのような代替製剤の従来の賦形剤および調製方法は、例えば、上記のRemingtonによる参考文献に記載されている。

40

【0071】

以下の限定されない例は、本発明の代表的な医薬組成物を示す。

ドライパウダー組成物

【0072】

本発明の微粉化された固体形態(1 g)を、粉碎されたラクトース(25 g)とブレンドする。次に、このブレンドした混合物を、用量あたり約0.1 mg ~ 約4 mgの式Iの化合物を提供するために十分な量で、剥離可能なブリスター包装の個々のブリスターに充填する。ブリスターの内容物を、ドライパウダー式吸入器を使用して投与する。

50

【0073】

ドライパウダー組成物

本発明の微粉化された固体形態(1g)を、粉碎されたラクトース(20g)とブレンドして、化合物対粉碎されたラクトースの重量比が1:20のバルク組成物を形成する。ブレンドされた組成物を、用量あたり約0.1mg~約4mgの式Iの化合物を送達可能なドライパウダー吸入装置に詰め込む。

【0074】

定量吸入器用組成物

本発明の微粉化された固体形態(10g)を、レシチン(0.2g)を脱塩水(200mL)に溶解させることによって調製した溶液に分散させる。得られる懸濁液を噴霧乾燥させた後、微粉化して、平均直径が約1.5μm未満の粒子を含む微粉化された組成物を形成する。次に、加圧した1,1,1,2-テトラフルオロエタンを、定量噴霧式吸入器によって投与された場合に、用量あたり約0.1mg~約4mgの式Iの化合物を提供するために十分な量で含有する定量吸入器のカートリッジに微粉化された組成物を充填する。

10

【0075】

ネブライザー組成物

本発明の固体形態(25mg)を1.5~2.5当量の塩酸を含む溶液に溶解させ、続いて水酸化ナトリウムを添加してpHを3.5~5.5およびグリセロールの3重量%に調整する。全ての成分が溶解するまで溶液をよく攪拌する。用量あたり約0.1mg~約4mgの式Iの化合物を提供するネブライザー装置を使用して溶液を投与する。

20

【0076】

眼注射用の水性製剤

滅菌水性懸濁液の各1mLには、5mg~50mgの本発明の固体形態、張性のための塩化ナトリウム、防腐剤としての0.99%(w/v)ベンジルアルコール、0.75%カルボキシメチルセルロースナトリウム、および0.04%ポリソルベートが含まれる。水酸化ナトリウムまたは塩酸を含めてpHを5~7.5に調整してもよい。

【0077】

眼注射用の水性製剤

滅菌防腐剤無添加水性懸濁液には、5mg/mL~50mg/mLの本発明の固体形態が、10mMリン酸ナトリウム、40mM塩化ナトリウム、0.03%ポリソルベート20、および5%スクロースに含まれる。

30

有用性

【0078】

本発明の化合物、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノール、(化合物1)は、酵素のJAKファミリー: JAK1、JAK2、JAK3、およびTYK2の強力な阻害剤であることが示された。

【0079】

呼吸器疾患

その上、下のアッセイに記載されるように、化合物1は、喘息および他の呼吸器疾患に関わる炎症促進性および線維化促進性サイトカインの強力な阻害を実証した。この化合物の吸収および分布は、前臨床アッセイでプロファイルされている。マウスにおいて、この化合物は、肺での曝露が血漿での曝露の約55倍大きいことを示した。重要なことに、マウス肺における化合物1の濃度はJAK酵素阻害の予測される薬力学的効果と相關することが示された。特に、この化合物は、マウス肺組織において炎症促進性サイトカインIL-13の作用を阻害することが示されている。具体的には、この化合物は、生体内での局所肺JAK標的結合の証拠をもたらし、肺組織におけるSTAT6のIL-13誘導性リン酸化の阻害を実証した。この作用は、炎症促進性サイトカインIL-13を試験化合物の投与の4時間後に投与した場合に観察されており、肺における著しい保持のさらなる

40

50

証拠を提供する。

【0080】

JAK阻害剤の抗炎症活性は、喘息の前臨床モデルにおいて強く実証されている (Maliyala, Int Immunopharmacol, 2010, 10, 829, -836; Matsunagaら, Biochem and Biophys Res Commun, 2011, 404, 261-267; Kudlaczら, Eur J Pharmacol, 2008, 582, 154-161)。したがって、本発明の化合物は、炎症性呼吸器疾患、特に喘息の処置に有用であることが予期される。肺の炎症および線維症は、喘息に加えてその他の呼吸器疾患、例えば慢性閉塞性肺疾患(COPD)、囊胞性線維症(CF)、間質性肺炎、間質性肺疾患(特発性肺線維症を含む)、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症状群、気管支炎、気腫、および閉塞性細気管支炎などの特徴である。そのため、本発明の化合物は、慢性閉塞性肺疾患、囊胞性線維症、間質性肺炎、間質性肺疾患(特発性肺線維症を含む)、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症状群、気管支炎、気腫、および閉塞性細気管支炎の処置にも有用であると予期される。上記のように、呼吸器疾患の処置のために、固体形態は吸入による投与に特に有用である。

10

【0081】

そのため、一態様では、本発明は、哺乳動物(例えば、ヒト)において呼吸器疾患を処置する方法を提供し、該方法は、哺乳動物に、治療有効量の本発明の化合物または薬学的に許容され得る担体と本発明の固体形態とを含む医薬組成物を投与することを含む。

20

【0082】

一態様では、呼吸器疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患、囊胞性線維症、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、囊胞性線維症(CF)、間質性肺炎、間質性肺疾患(特発性肺線維症を含む)、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症状群、気管支炎、気腫または閉塞性細気管支炎である。もう一つの態様では、呼吸器疾患は喘息または慢性閉塞性肺疾患である。もう一つの態様では、本発明の固体形態は、吸入によって投与される。

【0083】

本発明はさらに、哺乳動物において喘息を処置する方法を提供し、該方法は、哺乳動物に、本発明の固体形態または薬学的に許容され得る担体と本発明の固体形態とを含む医薬組成物を投与することを含む。

30

【0084】

喘息を処置するために使用される場合、本発明の化合物は、一般に、1日1回または1日複数回投与されるが、その他の投与形態を使用してもよい。活性剤の用量あたりに投与される量または一日に投与される総量は、一般に、処置される状態、選択された投与経路、投与された実際の化合物とその相対的活性、個々の患者の年齢、体重、および応答、患者の症状の重症度などを含む関連する状況を考慮して、医師が決定する。

40

【0085】

炎症に関連するサイトカインの強力な阻害が実証されたことに加えて、化合物1は、げっ歯類肺好酸球増加症および好中球増加症アッセイにおいてT細胞活性化の阻害および活性が実証された。そのため、本発明の固体形態は、さらなる呼吸器の状態の処置に有用であると考えられる。

【0086】

さらなる呼吸器の状態としては、肺感染症、蠕虫感染症、肺動脈性肺高血圧症、サルコイドーシス、リンパ脈管筋腫症、気管支拡張症、および浸潤性肺疾患が挙げられる。固体形態は、薬物誘導性間質性肺炎、真菌誘導性間質性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、特発性急性好酸球性肺炎、特発性慢性好酸球性肺炎、好酸球増加症状群、レフレル症状群、閉塞性細気管支炎性器質化肺炎、および免疫チェックポイント阻害剤誘発性間質性肺炎の処置にも有用であると考えられている。

【0087】

JAK-シグナル伝達サイトカインも、多くの免疫プロセスの中心となる免疫細胞のサブ

50

タイプであるT細胞の活性化において主要な役割を果たす。病理学的T細胞の活性化は、複数の呼吸器疾患の病因において重要である。自己反応性T細胞は、閉塞性細気管支炎性器質化肺炎(COSとも呼ばれる)において役割を果たす。COSと同様に、肺移植拒絶の病因は、移植されたドナー肺によるレシピエントT細胞の異常なT細胞活性化に関連している。肺移植拒絶は、原発性移植片機能不全(PGD)、器質化肺炎(OP)、急性拒絶反応(AR)またはリンパ球性細気管支炎(LB)として早期に発生するか、または肺移植の数年後に慢性肺同種移植片機能不全(CLAD)として発生することがある。CLADは以前には閉塞性細気管支炎(BO)として知られていたが、現在は、BO、拘束型CLAD(rCLADまたはRAS)および好中球性同種移植片機能不全をはじめとする様々な病理学的徴候を有する可能性のある症候群とみなされている。慢性肺同種移植片機能不全(CLAD)は、移植された肺の機能を徐々に失わせるので、肺移植レシピエントの長期管理に大きな課題がある(Gauthierら、*Curr Transplant Rep.*, 2016, 3(3), 185-191)。CLADは処置に対する反応性が低く、そのため、この状態を予防または処置することのできる効果的な化合物がなお必要とされている。数種のJAK依存性サイトカイン、例えばIFNおよびIL-5などは、CLADおよび肺移植拒絶において増加する(Berasteguiら、*Clin Transplant.* 2017, 31, e12898)。さらに、JAK依存性IFNシグナル伝達の下流にあるCXCL9およびCXCL10などのCXCR3ケモカインの肺レベルが高いことは、肺移植患者の転帰の悪化と関連している(Shinoharaら、*PLOS One*, 2017, 12(7), e0180281)。全身のJAK阻害は、腎臓移植拒絶において効果的であることが示された(Vicentiniら、*American Journal of Transplantation*, 2012, 12, 2446-56)。そのため、JAK阻害剤は、肺移植拒絶およびCLADを処置または予防するのに効果的である可能性がある。肺移植拒絶の基準として記載されている同様のT細胞活性化イベントも、造血幹細胞移植後に生じ得る肺移植片対宿主病(GVHD)の主な促進剤と考えられている。CLADと同様に、肺GVHDは、慢性的な進行性の状態であり、結果は極めて悪く、現在承認されている処置はない。サルベージ療法として全身JAK阻害剤ルキソリチニブを投与されたステロイド抵抗性の急性または慢性GVHD患者95名のレトロスペクティブな多施設調査研究により、肺GVHD患者を含む第多数の患者においてルキソリチニブに対する完全または部分的応答が実証された(Zeiserら、*Leukemia*, 2015, 29, 10, 2062-68)。全身性JAK阻害は重大な有害イベントおよび小さい治療係数に関連しているので、肺移植拒絶または肺GVHDを予防および/または処置するための吸入肺指向性の非全身性JAK阻害剤に対する必要性がまだある。

【0088】

したがって、本発明は、哺乳動物において、上記のさらなる呼吸器の状態を処置する方法をさらに提供し、該方法は、哺乳動物に、本発明の固体形態または薬学的に許容され得る担体と本発明の固体形態とを含む医薬組成物を投与することを含む。

【0089】

眼疾患

多くの眼疾患は、JAK-STAT経路に頼る炎症性サイトカインの上昇と関連していることが示されている。本発明の化合物は4つ全てのJAK酵素で強力な阻害を示すため、JAKを通じてシグナルを伝達する多数のサイトカイン(例えばIL-6、IL-2およびIFN-など)のシグナル伝達および病原性効果を強力に阻害すること、ならびにその産生がJAK-STAT経路シグナル伝達によって促進されるその他のサイトカイン(例えばMCP-1およびIP-10など)の増加を防ぐことが予期される。

【0090】

特に、化合物1は、サイトカイン上昇の下流効果の阻害を記録するアッセイを含むアッセイ3~7に記載される細胞アッセイにおいて、IL-2、IL-4、IL-6、およびIFNシグナル伝達の阻害について6.7またはそれ以上のpIC₅₀値(200nMまたはそれ以下のIC₅₀値)を示した。

10

20

30

40

50

【0091】

アッセイ12の薬物動態研究は、実施例2の結晶性化合物1の懸濁液の単回硝子体内注射後のウサギの目での持続的曝露、および硝子体組織で観察される濃度より少なくとも3桁低い血漿中濃度を実証した。アッセイ13および14は、ラットおよびウサギにおける化合物の薬力学的效果を実証した。

【0092】

そのため、本発明の固体形態は、以下に限定されるものではないが、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、ドライアイ病、加齢性黄斑変性、およびアトピー性角結膜炎を含む多数の眼疾患において有用であることが予期される。

【0093】

特に、ブドウ膜炎(Horai and Caspi, J Interferon Cytokine Res, 2011, 31, 733-744)、糖尿病性網膜症(Abcouwer, J Clin Cell Immunol, 2013, Suppl 1, 1-12)、糖尿病性黄斑浮腫(Sohnら、American Journal of Ophthalmology, 2011, 152, 686-694)、ドライアイ病(Stevensonら、Arch Ophthalmol, 2012, 130, 90-100)、および加齢性黄斑変性(Knickenbeinら、Int Ophthalmol Clin, 2015, 55(3), 63-78)は、JAK-STAT経路を介してシグナルを伝達する特定の炎症性サイトカインの上昇を特徴とする。したがって、本発明の固体形態は、関連する眼の炎症を緩和し、疾患の進行を逆転させるか、症状の緩和をもたらすことが可能であり得る。

10

【0094】

網膜静脈閉塞症(RVO)は、非常に一般的な視覚障害性疾患である。網膜血流の閉塞は、網膜脈管構造の損傷、出血、および組織虚血を導く可能性がある。RVOの原因は多因子性であるが、血管と炎症の両方のメディエーターが重要であることが示されている(Deobhaktaら、International Journal of Inflammation, 2013, article ID 438412)。JAK-STAT経路を通じてシグナルを伝達するサイトカイン、例えばIL-6およびIL-13など、ならびにその産生がJAK-STAT経路シグナル伝達によって促進される他のサイトカイン、例えばMCP-1などが、RVOの患者の眼組織において高いレベルで検出されている(Shchukinら、Indian Journal of Ophthalmology, 2015, 63(12), 905-911)。したがって、本発明の固体形態は、関連する眼の炎症を緩和し、疾患の進行を逆転させるか、この疾患の症状の緩和をもたらすことが可能であり得る。多くのRVO患者が光凝固によって処置されているが、これは本質的に破壊的な治療法である。抗VEGF剤も使用されているが、それらは一部の患者にしか効果的ではない。目の炎症レベルを低下させるステロイド投薬(トリアムシノロンアセトニドおよびデキサメタゾンインプラント)も特定の型のRVOの患者に有益な結果をもたらすことが示されているが、それらが白内障および眼圧上昇/緑内障を引き起こすことも示されている。

20

30

【0095】

そのため、一態様では、本発明は、哺乳動物において眼疾患を処置する方法を提供し、該方法は、本発明の固体形態を哺乳動物の目に投与することを含む。一態様では、眼疾患は、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、ドライアイ病、加齢性黄斑変性、またはアトピー性角結膜炎である。一態様では、眼疾患は網膜静脈閉塞症である。

40

【実施例】

【0096】

以下の合成および生物学的実施例は、本発明を説明するために提供され、決して本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。下の実施例において、以下の略語は、特に明記しない限り以下の意味を有する。以下に定義されていない略語は、一般に受け入れられている意味を有する。

50

A C N = アセトニトリル
C P M E = シクロペンチルメチルエーテル

D C M = ジクロロメタン
D I P E A = N , N - ジイソプロピルエチルアミン
D M A c = ジメチルアセトアミド
D M F = N , N - ジメチルホルムアミド
E t O A c = 酢酸エチル

h = 時間

I P A c = イソプロピルアセテート

K O A c = 酢酸カリウム

M e O H = メタノール

M e T H F = 2 - メチルテトラヒドロフラン

m i n = 分

M T B E = t e r t - ブチルメチルエーテル

N M P = N - メチル - 2 - ピロリドン

P d (a m p h o s) 2 C 1 2 = ビス (ジ - t e r t - ブチル (4 - ジメチルアミノフェニル) - ホスフィン) ジクロロパラジウム (I I)

P d (d p p f) C 1 2 = ジクロロ (1 , 1 ' - ビス (ジフェニルホスフィノ) - フェロセン) ジパラジウム (I I)

P d (P P h 3) 4 = テトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0)

P d (t - B u 3 P) 2 = ビス (トリ - t e r t - ブチルホスフィン) パラジウム (0)

R T = 室温

T E A = トリエチルアミン

T F A = トリフルオロ酢酸

T H F = テトラヒドロフラン

ビス (ピナコラート) ジボロン = 4 , 4 , 5 , 5 , 4 ' , 4 ' , 5 ' , 5 ' - オクタメチル - [2 , 2 '] ビ [[1 , 3 , 2] ジオキサボロラニル]

【 0 0 9 7 】

試薬および溶媒は商業的供給業者 (アルドリッヂ、F l u k a 、シグマ等) から購入し、さらなる精製を行わずに使用した。反応混合物の進行は、薄層クロマトグラフィー (T L C) 、分析用高速液体クロマトグラフィー (a n a l . H P L C) 、および質量分析によってモニターした。各反応において具体的に記載されているように、反応混合物を後処理した。一般に、それらは抽出、ならびにその他の精製方法、例えば温度依存性結晶化、溶媒依存性結晶化、および沈殿などによって精製された。さらに、反応混合物は、通常は C 1 8 または B D S カラムパッキングと従来の溶出剤を使用して、カラムクロマトグラフィーによるか、または分取 H P L C によって常套的に精製された。典型的な分取 H P L C 条件が下に記載される。

【 0 0 9 8 】

反応生成物の特性決定は、質量分析および ¹ H - N M R 分光分析によって常套的に実行された。N M R 分析のために、試料を重水素化溶媒 (例えは C D 3 O D 、 C D C l 3 、または d 6 - D M S O など) に溶解させ、標準的な観察条件下、V a r i a n G e m i n i 2 0 0 0 装置 (4 0 0 M H z) で ¹ H - N M R スペクトルを取得した。化合物の質量分析同定は、自動精製システムを組み合わせた、アプライドバイオシステムズ (カリフォルニア州フォスター・シティ) モデル A P I 1 5 0 E X 装置またはウォーターズ (マサチューセッツ州ミルフォード) 3 1 0 0 装置を用いるエレクトロスプレーイオン化法 (E S M S) によって実行した。

分取 H P L C 条件

カラム : C 1 8 、 5 μ m 、 2 1 . 2 × 1 5 0 m m または C 1 8 、 5 μ m 、 2 1 × 2 5 0 m m または C 1 4 、 5 μ m 、 2 1 × 1 5 0 m m

カラム温度 : 室温

10

20

30

40

50

流量 : 20.0 mL / 分
 移動相 : A = 水 + 0.05% TFA
 $B = ACN + 0.05\% TFA$ 、
 注入量 : (100 ~ 1500 μL)
 検出器波長 : 214 nm

【0099】

粗化合物を、1:1 水:酢酸に約50mg/mLで溶解させた。2.1×50mmのC18カラムを使用して4分の分析規模試験を実行し、それに続いて、実施した分析規模試験のB保持%に基づく勾配で100μLの注入を用いて15または20分の分取規模を実行した。正確な勾配は試料に依存した。最適な分離のために、近接して流れる不純物を含む試料を21×250mm C18カラムおよび/または21×150mm C14カラムでチェックした。目的生成物を含有する画分を質量分析によって特定した。

分析HPLC条件

方法A

カラム : アジレント・Zorbax Bonus - RP C18、150×4.60nm、
 3.5ミクロン

カラム温度 : 40

流量 : 1.5 mL / 分

注入量 : 5 μL

試料の調製 : 1:1 ACN : 1M HClに溶解

移動相 : A = 水 : TFA (99.95:0.05)

 $B = ACN : TFA (99.95:0.05)$

検出器波長 : 254 nm および 214 nm

勾配 : 合計26分 (時間(分) / %B) : 0/5、18/90、22/90、22.5/90、26/5

方法B

カラム : アジレント Poroshell 120 Bonus - RP、4.6×150mm
 、2.7 μm

カラム温度 : 30

流量 : 1.5 mL / 分

注入量 : 10 μL

移動相 : A = ACN : 水 : TFA (2:98:0.1)

 $B = ACN : 水 : TFA (90:10:0.1)$

試料の調製 : 移動相Bに溶解

検出器波長 : 254 nm および 214 nm

勾配 : 合計60分 (時間(分) / %B) : 0/0、50/100、55/100、55.1/0、60/0

方法C

カラム : アジレント Poroshell 120 Bonus - RP、4.6×150mm、2.7 μm

カラム温度 : 30

流量 : 1.5 mL / 分

注入量 : 10 μL

移動相 : A = ACN : 水 : TFA (2:98:0.1)

 $B = ACN : 水 : TFA (90:10:0.1)$ 試料の調製 : 移動相B (0.15mL) に溶解させた後、移動相A (0.85mL) で希釈
 検出器波長 : 245 nm

勾配 : 合計46分 (時間(分) / %B) : 0/0、25/50、35/100, 40/100、40.1/0、46/0

【0100】

10

20

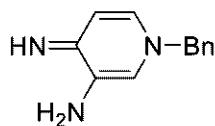
30

40

50

調製 1 : 1 - ベンジル - 4 - イミノ - 1 , 4 - ジヒドロピリジン - 3 - アミン

【化 3】



【0101】

ピリジン - 3 , 4 - ジアミン (445 g, 4.078 mol) と A C N (11.0 L) の混合物を、25 から 15 まで 80 分間攪拌した。臭化ベンジル (485 mL, 4.078 mol) を 20 分にわたり添加し、反応混合物を 20 で一晩攪拌した。反応混合物を 10 に冷却し、濾過した。反応器に A C N (3 L) を添加し、これを 10 に冷却した。ケーキを反応器のすすぎ液で洗浄し、25 に温めた A C N (3 L) で再び洗浄した。固体をフィルター上で、窒素下で 24 時間、真空下 55 で 2 時間、次に室温で一晩および 4 日間乾燥させて、表題化合物の H B r 塩を得た (1102.2 g, 3.934 mol, 収率 96 %)。H P L C 方法 A 保持時間 4.12 分。

10

【0102】

調製 2 : 5 - ベンジル - 2 - (6 - プロモ - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 5 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン

【化 4】

20



(a) 5 - ベンジル - 2 - (6 - プロモ - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 5 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン

【0103】

30

6 - プロモ - 1 H - インダゾール - 3 - カルバルデヒド (550 g, 2.444 mol) 、1 - ベンジル - 4 - イミノ - 1 , 4 - ジヒドロピリジン - 3 - アミン H B r (721 g, 2.333 mol) および D M A c (2.65 L) の溶液を 60 分間攪拌し、重亜硫酸ナトリウム (257 g, 2.468 mol) を添加した。反応混合物を 135 に加熱し、3 時間保持し、20 まで冷却させて 20 で一晩保持した。アセトニトリル (8 L) を添加し、反応混合物を 15 で 4 時間攪拌した。スラリーを圧力フィルターで中程度の濾過速度で濾過した。反応器に A C N を添加した (1 L) ケーキを A C N 反応器の洗液で洗浄し、窒素下で一晩、次に真空下 50 で 24 時間乾燥させて、表題化合物の H B r 塩 (1264 g, 2.444 mol, 収率 100 %, 純度 94 %) を、高密度の湿ったベージュ色 / 茶色の固体として得た。H P L C 方法 A 保持時間 8.77 分。

40

【0104】

前のステップの生成物 (1264 g, 2.444 mol) 、M e T H F (6 L) および水 (2.75 L) の混合物を 65 に加熱し、50 重量 % の水酸化ナトリウム (254 g, 3.177 mol) を 5 分にわたり添加し、反応混合物を 65 で 1 時間攪拌し、室温に冷却し、次に 5 冷却して 2 時間保持した。スラリーを濾過し、反応器およびケーキを M e T H F (1 L) で洗浄した。得られたベージュ色から黄色の固体をフィルター上で窒素下 3 日間乾燥させて、表題化合物 (475 g, 1.175 mmol, 収率 48 %) をベージュ色 / 黄色の固体として得た。母液 (約 8 L) を約 2 L に濃縮するとすぐ、固体が砕け始めた。スラリーを 50 に加熱し、2 時間保持し、2 時間にわたり 5 に冷却し、一晩攪拌し、濾過した。ケーキを M e T H F (100 mL) で洗浄し、真空下 40 で一

50

晩乾燥させて、さらなる表題化合物を得た(140 g、0.346 mol、収率14%)。

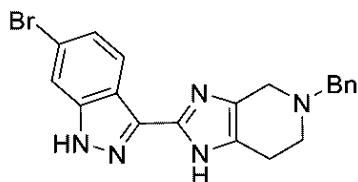
【0105】

同じ規模の第2のバッチの生成物と組み合わせた前のステップの総生成物(1500 g、3.710 mol)とMeTHF(4 L)の混合物を20で2時間攪拌し、濾過した。反応器およびケーキをMeTHF(1.5 L)で洗浄した。得られたベージュ色から黄色の固体を窒素下3日間乾燥させて、表題化合物をベージュイエローの固体として得た(1325 g、3.184 mol、収率86%(全体で収率68%)、純度97%)。HPLC方法A保持時間8.77分

【0106】

調製3:5-ベンジル-2-(6-ブロモ-1H-インダゾール-3-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン

【化5】



【0107】

15 L フラスコに、5-ベンジル-2-(6-ブロモ-1H-インダゾール-3-イル)-5H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン(440 g、1.088 mol)、続いてMeTHF(4.5 L)、メタノール(2.25 L)および水(1.125 L)を添加した。スラリーを20に冷却し、1時間攪拌し、NaBH4(247 g、6.530 mol)を添加した。反応混合物を25で18時間攪拌した。水(1.125 L)と、それに続いて20重量%の塩化ナトリウム溶液(1.125 L)を添加し、混合物を30分間攪拌し、層を分離させた。水層を排出した。NaOH(522 g)と水(5 L)の予備混合溶液を添加し、反応混合物を60分間攪拌した;層を分離させ、水層を排出した。同じ規模の2つの追加のバッチを調製した。

【0108】

1つのバッチから有機層を、ジャケットを50、内部温度を20に設定した15 L ジャケット付き反応器内で減圧下で濃縮した。追加のバッチを反応器に添加し、一度に1つ濃縮して、体積が約6 Lのスラリーを得た。スラリーを50に加熱し、IPA c(6 L)を添加し、混合物を60で1.5時間保持し、20に10時間冷却し、60に50時間加熱し、5時間で20に冷却し、次に5に冷却し、3時間保持した。混合物を濾過し、反応器およびケーキをIPA c(1 L)とMeTHF(1 L)の予備混合溶液で洗浄し、5に予備冷却した。固体をフィルター上で窒素下40で3日間乾燥させて、表題化合物(1059 g、2.589 mol、収率79%)を灰白色固体として得た。この材料を50~60の真空炉内で8時間および27で2日間さらに乾燥させて、表題化合物を得た(1043 g、2.526 mol、収率77%、純度99%)。HPLC方法A保持時間6.73分

【0109】

調製4:(4-(ベンジルオキシ)-2-エチル-5-フルオロフェニル)トリフルオロボレート、カリウム

10

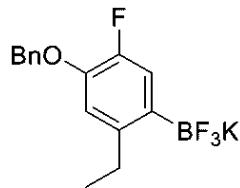
20

30

40

50

【化6】



【0110】

(a) 2 - (4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) - 4 , 4 , 10
5 , 5 - テトラメチル - 1 , 3 , 2 - ジオキサボロラン

1 - (ベンジルオキシ) - 4 - プロモ - 5 - エチル - 2 - フルオロベンゼン (520 g, 1682 mmol) とジオキサン (5193 mL) の混合物を窒素でバージし、次にビス(ピナコラート)ジボロン (641 g, 2523 mmol) を添加し、続いて酢酸カリウム (495 g, 5046 mmol) を添加した。反応混合物を窒素でバージし；Pd(dppf)Cl₂ (41.2 g, 50.5 mmol) を添加し；反応混合物を窒素でバージし、窒素下103 °C で5時間加熱し；室温に冷却した。反応混合物を減圧蒸留により濃縮し、酢酸エチル (5204 mL) と水 (5212 mL) とに分液した。反応混合物をセライトで濾過し；有機層をブライン (2606 mL) で洗浄し、続いて減圧蒸留により溶媒を除去して粗生成物を濃厚な黒色の油として得た (約800 g)。

【0111】

粗生成物をDCM (1289 mL) に溶解させ、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製した (ヘキサン中に予備スラリー化した (preslurred) シリカ 2627 g、ヘキサン中 20 % 酢酸エチルで溶出 (10.35 L))。溶媒を減圧蒸留によって除去して、淡黄色の油を得た (600 g)。HPLC 方法 B 保持時間 33.74 分。

【0112】

(b) (4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) トリフルオロボレート、カリウム

前のステップの生成物 (200 g, 561 mmol) をアセトン (1011 mL) と完全に溶解するまで混合し、メタノール (999 mL) を添加し、水 (1310 mL) に溶解させた 3 M ニフッ化水素カリウム (307 g, 3930 mmol) を続いて添加した。反応混合物を 3.5 時間攪拌した。有機溶媒の大部分を減圧蒸留によって除去した。水 (759 mL) を添加し、得られる濃厚なスラリーを 30 分間攪拌し、濾過した。ケーキを水 (506 mL) で洗浄し、固体をフィルター上で 30 分間乾燥させた。固体をアセトン (1237 mL) 中でスラリー化し、1 時間攪拌した。得られるスラリーを濾過し、固体をアセトン (247 mL) で洗浄した。アセトン溶液を減圧蒸留によって濃縮し、すべてのアセトンおよび水が蒸留されるまで、トルエン (2983 mL) をゆっくりと添加することにより、一定体積 (2 L) を維持した。トルエン溶液を回転蒸発により濃厚な黄色スラリーに蒸留し、その間に生成物が白色固体として沈殿した。トルエンの追加部分 (477 mL) を混合物に添加し、1 時間攪拌した。次に、混合物を濾過し、トルエン (179 mL) ですすぎ、真空下 50 °C で 24 時間乾燥させて表題化合物 (104 g, 310 mmol、収率 55 %) を流動性のある、ふわふわした、わずかに灰白色の固体として得た。HPLC 方法 B 保持時間 27.71 分。

【0113】

調製 5 : 5 - ベンジル - 2 - (6 - (4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン

10

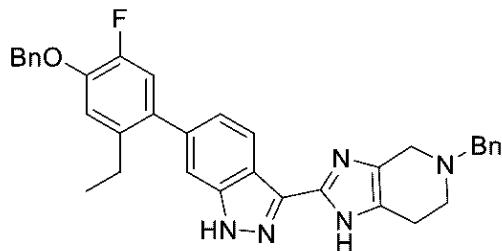
20

30

40

50

【化7】



【 0 1 1 4 】

(a) 5 - ベンジル - 2 - (6 - (4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン

ビス(ピナコラート)ジボロン(250 g, 984 mmol)とIPA(1.88 L)の混合物を攪拌して溶解させ、次に二フッ化水素カリウム(538 g, 6.891 mol)の水溶液(2.31 L)を少量ずつ10分にわたり添加した。反応混合物を1時間攪拌し、濾過した。ゲル状の固体を、混合物が透明なヒドロゲルを形成するまで水(1.33 L)でスラリー化し、次にさらに45分間行った。得られる固体/ゲルを濾過し、次にアセトン(1.08 L)で再びスラリー化し、濾過し、フィルター上で30分間風乾させ、一晩乾燥させてふわふわした白色の固体を得た(196.7 g)。

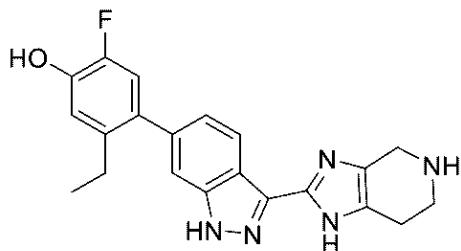
【 0 1 1 5 】

5 L フラスコに、5 - ベンジル - 2 - (6 - ブロモ - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン (135 g, 331 mmol) 、(4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) - トリフルオロボレート、カリウム (133 g, 397 mmol) 、および前のステップの白色固体生成物 (40.5 g) を添加し、続いて MeTHF (1.23 L) および MeOH (1.75 L) を添加した。得られるスラリーを窒素で3回脱気した。このスラリーに、脱気した炭酸セシウム (431 g, 1.323 mol) の水 (1.35 L) 中溶液を添加した。スラリーを2回脱気し、Pd (amphos) ₂C12 (11.71 g, 16.53 mmol) を添加し、スラリーを再び2回脱気し、反応混合物を67で一晩攪拌し、20に冷却した。層を分離し、MeTHF (550 mL) で逆抽出した。有機層を合し、回転蒸発によって固体が沈殿するまで濃縮した。MeTHF (700 mL) を添加し、反応混合物を65で攪拌した。層を分離し、水相をMeTHF (135 mL) で逆抽出した。有機相を合し、約300 mL に濃縮し、濃厚な橙色のスラリーを得た。このスラリーに、MeOH (270 mL) を添加し、続いて1M HCl (1.325 L) を20で急速に攪拌しながら添加した。反応混合物を5分間攪拌し、水 (1 L) を添加し、得られるスラリーを1時間攪拌した。固体を濾過し、水 (150 mL) で洗浄し、フィルター上で10分間および窒素下45で16時間乾燥させて、表題化合物の2HCl塩 (221.1 g, 351 mmol、純度92.2%) を淡黄色の固体として得た。HPLC方法B保持時間23.41分。

【 0 1 1 6 】

調製 6 : 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノール

【化8】



【0117】

1 L フラスコに、エタノール (348 mL) 中のスラリーとしての 5 - ベンジル - 2 - (6 - (4 - (ベンジルオキシ) - 2 - エチル - 5 - フルオロフェニル) - 1 H - インダゾール - 3 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン、2 HCl (40 g, 63.4 mmol) と、MeOH (101 mL) および水 (17.14 mL) 中 1.25 M HCl を添加した。反応混合物を窒素で 5 分間脱気し、10 重量% の Pd/C、50 重量% の H₂O (4.05 g, 1.903 mmol) を添加した。反応器を密閉し、H₂ でバージし、1 ~ 2 psi に加圧し、50 に加温し、反応混合物を一晩攪拌し、セライトで濾過した。反応器およびフィルターをメタノール (100 mL) で洗浄した。

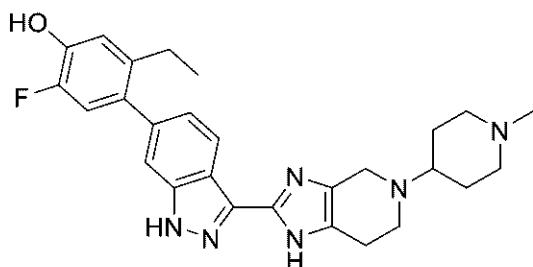
【0118】

濾過溶液を 98 mmol スケールの第 2 のバッチの生成物と合し、390 g に濃縮した。EtOAc (2.04 L) を攪拌しながらゆっくり添加し、次に溶液を攪拌しながら 5 に冷却した。固体を濾過し、EtOAc (510 mL) で洗浄し、窒素下 45 で一晩乾燥させて、表題化合物の 2 HCl 塩 (58 g、收率 80%) を灰白色固体として得た。HPLC 方法 B 保持時間 12.83 分。

【0119】

実施例 1 : 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノール水和物

【化9】



【0120】

125 mL フラスコに、NMP (19.23 mL) および 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノール、2 HCl (6 g, 13.32 mmol) を攪拌しながら添加し、続いて NMP (19.23 mL) を添加した。酢酸 (2.52 mL) を添加し、次に 1 - メチルピペリジン - 4 - オン (3.28 mL, 26.6 mmol) を一度に添加し、反応混合物を 25 で 30 分間攪拌し、15 に冷却した。トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (7.91 g, 37.3 mmol) を添加し、20 分後に外部ジャケットを 20 に設定した。3.5 時間後、総溶液量は 35 mL であった。反応器をメタノール (5 mL) で洗浄した。温度を 5 未満に維持しながら、溶液の半量 (17.5 mL) と、それに続いてメタノール洗液の半量 (2.5 mL) を、メタノ

10

20

30

40

50

ール (2 8 m L) 、水酸化アンモニウム (1 7 m L 、 2 7 0 m m o l) および水 (9 m L) の予備混合溶液に添加した。10分後に固体が沈殿した。スラリーを30分間攪拌し、ACN (6 0 m L) を30分にわたりゆっくりと添加し、スラリーを0で2時間攪拌し、濾過し、ACNですすいだ。固体を50で12時間乾燥させて、表題化合物 (2 . 9 5 g 、収率 9 3 . 2 % 、(含水量を補正した収率 8 5 . 2 %)) を灰白色固体として得た。HPLC方法C保持時間 1 2 . 1 1 分。

【 0 1 2 1 】

実施例 2 : 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールの結晶性水和物

10

【 0 1 2 2 】

実施例 A で調製した 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノール (1 0 g 、 2 1 . 0 7 m m o l) の D M S O (1 9 . 9 9 m L) 中溶液に、エタノール (1 9 . 9 3 m L) を添加した。溶解しなかった固体を濾過によって除去し、D M S O 溶液の半量をメタノール (3 0 m L) 中 2 0 % 水の攪拌溶液に添加した。スラリーは 1 0 分後に生じ、これを室温で 4 時間攪拌し、濾過した。得られる黄色の固体を窒素下 5 0 で 3 時間乾燥させた。固体をアセトン中 2 0 % 水 (1 1 0 m L) に 4 5 で攪拌しながら 3 5 時間スラリー化し、濾過し、アセトン中 1 5 % 水で洗浄し、一晩乾燥させて、表題化合物 (4 . 4 0 g 、収率 8 8 %) を淡黄色の固体として得た。

20

【 0 1 2 3 】

実施例 3 : 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールの結晶性シュウ酸塩水和物

【 0 1 2 4 】

2 0 m L ガラスバイアル中で、実施例 2 の生成物である化合物 1 の結晶性水和物 (2 4 8 . 5 m g) 、およびシュウ酸無水物 (4 8 . 0 m g) を、 1 : 1 テトラヒドロフラン : 水 (5 m L) に溶解させた。アセトニトリル (5 m L) を添加して懸濁液を生成した。得られる反応混合物を 1 日間室温で攪拌し、濾過し、アセトニトリル (2 m L) で洗浄し、周囲条件下で一晩乾燥させて、表題化合物を得た。

30

【 0 1 2 5 】

実施例 4 : 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールの結晶性コハク酸塩水和物

【 0 1 2 6 】

4 m L ガラスバイアル中で、化合物 1 の結晶性水和物 (4 0 m g) およびコハク酸 (1 0 m g) をイソプロパノール (1 m L) 中に懸濁させた。反応混合物懸濁液を 7 日間室温で攪拌した。固体を濾過し、イソプロパノール (0 . 5 m L) で洗浄し、周囲条件下で一晩乾燥させて、結晶性コハク酸塩溶媒和物を得た。単離したコハク酸塩溶媒和物固体を 1 5 0 で 3 0 分間真空炉で乾燥させて、第 2 の固体形態を得、これを 8 0 % ~ 9 0 % の相対湿度で 1 日間室温で平衡化させて、表題化合物を得た。

40

【 0 1 2 7 】

実施例 5 ~ 7 : 本発明の固体形態の特性

実施例 3 の 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物および実施例 4 の 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物の試料

50

を、粉末X線回折(PXRD)、示差走査熱量測定(DSC)、熱重量分析(TGA)、および動的水分吸着(DMS)によって分析した。

【0128】

実施例5 粉末X線回折

図1の粉末X線回折パターンは、45kVの出力電圧および40mAの電流でCu-K放射線(=1.54051)を使用するBruker D8-Advance X線回折計で得られた。この装置は、試料で強度を最大化するよう設定された入射、発散、および散乱スリットを備えるBragg-Brentano配置で動作した。測定のために、少量の粉末(5~25mg)を試料ホルダーに静かに押し付けて滑らかな表面を形成させ、X線照射にさらした。試料は、0.02°のステップサイズおよび1ステップあたり0.30°秒の走査速度で2°で2°から40°まで2°-2°モードで走査された。データの取得はBruker Diffract Suite測定ソフトウェアによって制御され、Jadeソフトウェア(バージョン7.5.1)によって分析された。装置は、コランダム標準を用いて、±0.02°の2シータ角以内に較正された。本発明の結晶性シュウ酸塩水和物および結晶性コハク酸塩水和物についてそれぞれ観察されたPXRD 2ピーク位置およびd間隔を表1および2に示す。

【表1】

表1:結晶性シュウ酸塩水和物のPXRDデータ

2θ	d(Å)	面積	A%
6.77	13.05	31716	41.0
11.56	7.65	6303.00	8.20
12.13	7.29	20994	27.2
13.54	6.53	77308	100.0
14.29	6.19	4903.00	6.30
16.96	5.22	9024	11.7
17.23	5.14	27774	35.9
17.72	5.00	19582	25.3
18.00	4.92	39472	51.1
18.55	4.78	31259	40.4
18.76	4.73	18293	23.7
19.51	4.55	14796	19.1
20.18	4.40	11319	14.6
20.69	4.29	16629	21.5
21.38	4.15	14261	18.4
21.98	4.04	18621	24.1
22.30	3.98	17504	22.6
23.63	3.76	14213	18.4
24.12	3.69	29375	38.0
24.34	3.65	19430	25.1
24.67	3.61	15460	20.0
27.05	3.29	20767	26.9
27.26	3.27	24154	31.2
28.85	3.09	8021	10.4
29.80	3.00	14992	19.4
30.13	2.96	17939	23.2
31.05	2.88	7191	9.3

10

20

30

40

50

【0129】

【表2-1】

表2:結晶性コハク酸塩水和物のPXRDデータ

2θ	d(Å)	面積	A%
4.81	18.34	58400	25.80
9.66	9.14	92725	41.00
10.46	8.45	17225	7.60
13.45	6.58	5912	2.60
13.78	6.42	6010	2.70
14.93	5.93	93135	41.20
16.21	5.46	24930	11.00
16.78	5.28	226066	100.00
17.45	5.08	49392	21.80
19.10	4.64	53460	23.60
19.61	4.52	80964	35.80
21.20	4.19	70129	31.00
21.92	4.05	51995	23.00
22.87	3.88	67007	29.60
24.77	3.59	81836	36.20
27.27	3.27	4553	2.00
28.09	3.17	18019	8.00
28.77	3.10	17372	7.70
30.68	2.91	5202	2.30
31.74	2.82	14150	6.30

【0130】

実施例6:熱分析

示差走査熱量測定(DSC)を、Thermal Analystコントローラーを備えるTA Instruments Model Q-100モジュールを使用して実施した。データを収集し、TA Instruments Thermal Analysisソフトウェアを用いて解析した。各結晶形態の試料を、蓋付きのアルミニウムパンに正確に秤量した。5で5分の等温平衡期間の後、試料を10/分の線形加熱勾配で0から250に加熱した。本発明の結晶性シュウ酸塩水和物および結晶性コハク酸塩水和物の代表的なDSCサーモグラムを、それぞれ図2および6に示す。

【0131】

熱重量分析(TGA)測定は、高分解能を備えるTA Instruments Model Q-50モジュールを使用して実施した。TA Instruments Thermal Analystコントローラーを使用してデータを収集し、TA Instruments Universal Analysisソフトウェアを用いて解析した。秤量した試料を白金パンの上に載せ、周囲温度から300まで10の加熱速度で走査した。使用中、天秤および炉室に窒素流をバージした。本発明の結晶性シュウ酸塩水和物および結晶性コハク酸塩水和物の代表的なTGAトレースを、それぞれ図3および7に示す。

実施例7:動的水分吸着の評価

【0132】

動的水分吸着(DMS)測定を、VTI大気微量天秤、SGA-100システム(VTI Corp., Hialeah, FL 33016)を使用して実施した。秤量した試料を使用し、解析の開始時の湿度は、可能な限り最低の値(0%RHに近い値)であった。DMS解析は、120分間の最初の乾燥ステップ(約0%RH)と、それに続く2サイクル

10

20

30

40

50

の吸着および脱着からなり、走査速度は 5 % R H ~ 9 0 % R H の湿度範囲で 5 % R H / ステップであった。D M S の実行は、2 5 で等温的に実施した。本発明の結晶性シュウ酸塩水和物および結晶性コハク酸塩水和物の代表的なD M S トレースを、それぞれ図4および8に示す。

生物学的アッセイ

【0 1 3 3】

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 6 - イル) フェノール (化合物 1) は、以下の生物学的アッセイにおいて特徴付けられている。

10

【0 1 3 4】

アッセイ1：生化学的J A Kキナーゼアッセイ

4つのL a n t h a S c r e e n J A K生化学的アッセイのパネル (J A K 1 、 2 、 3 および T y k 2) は、一般的なキナーゼ反応緩衝液 (5 0 m M H E P E S , p H 7 . 5 、 0 . 0 1 % B r i j - 3 5 、 1 0 m M M g C l 2 および 1 m M E G T A) に含められた。組換えG S Tタグ付きJ A K酵素およびG F Pタグ付きS T A T 1ペプチド基質をライフテクノロジーズより入手した。

【0 1 3 5】

段階希釈した化合物を、白色の3 8 4 ウエルマイクロプレート (C o r n i n g) 中で4つのJ A K酵素の各々および基質とともに周囲温度で1時間プレインキュベートした。その後、A T Pを添加して1% D M S Oを含む1 0 μ Lの総体積でキナーゼ反応を開始させた。J A K 1 、 2 、 3 および T y k 2 の最終酵素濃度はそれぞれ 4 . 2 n M 、 0 . 1 n M 、 1 n M 、 および 0 . 2 5 n M であり；使用した対応する K m A T P 濃度は、 2 5 μ M 、 3 μ M 、 1 . 6 μ M 、 および 1 0 μ M であり；一方、4つのアッセイすべての基質濃度は 2 0 0 n M である。キナーゼ反応を周囲温度で1時間進めた後、T R - F R E T 希釈緩衝液 (ライフテクノロジーズ) 中の E D T A (最終濃度 1 0 m M) および T b - 抗 p S T A T 1 (p T y r 7 0 1) 抗体 (ライフテクノロジーズ、最終濃度 2 n M) の 1 0 μ L 調製物を添加した。プレートを周囲温度で1時間インキュベートさせた後、E n V i s i o n リーダー (パーキンエルマー) で読み取った。発光比シグナル (5 2 0 n m / 4 9 5 n m) を記録し、それを用いて、D M S O およびバックグラウンド対照に基づいて阻害パーセントの値を計算した。

20

【0 1 3 6】

用量反応解析には、阻害パーセントのデータを化合物濃度に対してプロットし、P r i s mソフトウェア (G r a p h P a d S o f t w a r e) による4パラメータのロバストなフィットモデルから I C 5 0 値を決定した。結果を p I C 5 0 (I C 5 0 の負の対数) として表し、その後 C h e n g - P r u s o f f 式を用いて p K i (解離定数の負の対数、 K i) に変換した。

30

【0 1 3 7】

化合物1は、以下の酵素能力を示した。

【表2 - 2】

40

表2

JAK1 pK _i	JAK2 pK _i	JAK3 pK _i	Tyk2 pK _i
10.2	10.8	9.7	9.8

【0 1 3 8】

アッセイ2：細胞J A K効力アッセイ：I L - 1 3 の阻害

A l p h a S c r e e n J A K I 細胞効力アッセイを、B E A S - 2 B ヒト肺上皮細胞 (A T C C) においてインターロイキン - 1 3 (I L - 1 3 、 R & D S y s t e m s)

50

誘導性のSTAT6リン酸化を測定することによって行った。抗STAT6抗体(Cel1 Signaling Technologies)をAlphaScreenアクセプタービーズ(パークインエルマー)に結合させ、抗pSTAT6(pTyr641)抗体(Cel1 Signaling Technologies)を、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin(Thermo Scientific)を用いてビオチン化した。

【0139】

BEAS-2B細胞を、5%CO₂加湿インキュベーターにおいて、10%FBS(Hyclone)、100U/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン(ライフテクノロジーズ)、および2mMGlutamax(ライフテクノロジーズ)を補充した50%DMEM/50%F-12培地(ライフテクノロジーズ)中、37で増殖させた。アッセイの1日目に、25μLの培地を有する白色のポリ-D-リジンでコーティングした384ウェルプレート(Corning)に7,500細胞/ウェルの密度で細胞を播種し、恒温器内で一晩接着させた。アッセイの2日目に、培地を除去し、試験化合物の用量反応物を含有する12μLのアッセイ緩衝液(ハンクス平衡塩類溶液/HBSS、25mMHEPESおよび1mg/mlウシ血清アルブミン/BSA)と交換した。化合物をDMSOで段階希釈し、次いで、最終DMSO濃度が0.1%になるようにさらに培地で1000倍希釈した。細胞を37で1時間試験化合物とともにインキュベートし、続いて、刺激のために、12μLの予め温めたIL-13(アッセイ緩衝液中80ng/ml)を添加した。37で30分間インキュベートした後、アッセイ緩衝液(化合物およびIL-13を含有)を除去し、10μLの細胞溶解緩衝液(25mMHEPES、0.1%SDS、1%NP-40、5mM MgCl₂、1.3mM EDTA、1mM EGTA、ならびにRoche Diagnostics製のComplete Ultraミニプロテアーゼ阻害剤およびPhosSTOPによる補充)。プレートを周囲温度で30分間振盪した後、検出試薬を添加した。ビオチン-抗pSTAT6および抗STAT6結合アクセプタービーズの混合物を最初に添加し、周囲温度で2時間インキュベートし、続いてストレプトアビシン結合ドナービーズ(パークインエルマー)を添加した。最低2時間のインキュベーションの後、アッセイプレートをEnVisionプレートリーダーで読み取った。AlphaScreenルミネセンスシグナルを記録し、それを用いて、DMSOおよびバックグラウンド対照に基づいて阻害パーセントの値を計算した。

【0140】

用量反応解析には、阻害パーセントのデータを化合物濃度に対してプロットし、Pris mソフトウェアによる4パラメータのロバストなフィットモデルからIC₅₀値を決定した。結果は、IC₅₀の負の対数である、pIC₅₀として表してもよい。化合物1はこのアッセイで8.2のpIC₅₀値を示した。

【0141】

アッセイ3：細胞JAK効力アッセイ：ヒトPBM CにおけるIL-2/抗CD3刺激IFNの阻害

インターロイキン-2(IL-2)/抗CD3で刺激したインターフェロンガンマ(IFN)の阻害についての試験化合物の効力を、ヒト全血(Stanford Blood Center)から単離したヒト末梢血単核細胞(PBMC)において測定した。IL-2はJAKを通じてシグナルを伝達するので、このアッセイはJAKの細胞効力の尺度を提供する。

【0142】

(1)ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、フィコール密度勾配を用いて健康なドナーのヒト全血から単離した。細胞を、5%CO₂加湿インキュベーターにおいて、10%熱失活ウシ胎仔血清(FBS、ライフテクノロジーズ)、2mMGlutamax(ライフテクノロジーズ)、25mMHEPES(ライフテクノロジーズ)および1XPen/Strep(ライフテクノロジーズ)を補充した RPMI(ライフテクノロジーズ)、37で培養した。細胞を200,000細胞/ウェルで培地(50μL)に播種し、1時

10

20

30

40

50

間培養した。化合物をDMSOで段階希釈し、次に培地でさらに500倍（最終アッセイ濃度の2倍）に希釈した。試験化合物（100 μL / ウエル）を細胞に添加し、37、5%CO₂で1時間インキュベートし、続いて24時間予め温めた培地（50 μL）にIL-2 (R&D Systems; 最終濃度100 ng / mL) および抗CD3 (BD Biosciences; 最終濃度1 μg / mL) を添加した。

【0143】

(2) サイトカイン刺激後、細胞を500 gで5分間遠心分離し、上清を除去し、-80で凍結させた。IL-2 / 抗CD3に応答する試験化合物の阻害効力を決定するために、上清のIFN濃度をELISA (R&D Systems) によって測定した。IC₅₀値は、化合物濃度に対するIFNの濃度の阻害曲線の解析から決定した。データはpIC₅₀ (10を底とする負の対数IC₅₀) 値として表される。化合物1は、このアッセイで約7.3のpIC₅₀値を示した。

10

【0144】

アッセイ4：細胞JAK効力アッセイ：CD4+T細胞におけるIL-2刺激pSTAT5の阻害

インターロイキン-2 (IL-2) / 抗CD3で刺激したSTAT5のリン酸化の阻害についての試験化合物の効力を、フローサイトメトリーを用いてヒト全血 (Stanford Blood Center) から単離したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) のCD4陽性 (CD4+) T細胞において測定した。IL-2はJAKを通じてシグナルを伝達するので、このアッセイはJAKの細胞効力の尺度を提供する。

20

【0145】

CD4+T細胞を、抗CD4抗体 (Clone RPA-T4、BD Biosciences) と結合したフィコエリスロビリン (PE) を使用して特定し、一方、Alexa Fluor 647結合抗pSTAT5抗体 (pY694、Clone 47、BD Biosciences) を使用してSTAT5リン酸化を検出した。

【0146】

(1) 抗CD3によるサイトカイン刺激を24時間の代わりに30分間実施したことを除いて、アッセイ3の段落(1)のプロトコールに従った。

【0147】

(2) サイトカイン刺激の後、細胞を予め温めた固定液 (200 μL; BD Biosciences) で37、5%CO₂で10分間固定し、DPBS緩衝液 (1 mL、ライフテクノロジーズ) で2回洗浄し、氷冷Perm Buffer III (1000 μL、BD Biosciences) 中に4で30分間再度懸濁させた。細胞をDPBS (FACS緩衝液) 中2%FBSで2回洗浄し、次に抗CD4 PE (1:50希釈) および抗CD3 抗CD3 Alexa Fluor 647 (1:5希釈) を含有するFACS緩衝液 (100 μL) 中に暗所で室温で60分間再度懸濁させた。インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後に、LSRIIフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析した。IL-2 / 抗CD3に応答する試験化合物の阻害効力を決定するために、pSTAT5の蛍光強度中央値 (MFI) をCD4+T細胞で測定した。IC₅₀値は、化合物濃度に対するMFIの阻害曲線の解析から決定した。データはpIC₅₀ (10を底とする負の対数IC₅₀) 値として表される。化合物1は、このアッセイで約7.7のpIC₅₀値を示した。

30

40

【0148】

アッセイ5：細胞JAK効力アッセイ：CD3+T細胞におけるIL-4刺激pSTAT6の阻害

インターロイキン-4 (IL-4) で刺激したSTAT6のリン酸化の阻害についての試験化合物の効力を、フローサイトメトリーを用いてヒト全血 (Stanford Blood Center) から単離したヒト末梢血単核細胞 (PBMC) のCD3陽性 (CD3+) T細胞において測定した。IL-4はJAKを通じてシグナルを伝達するので、このアッセイはJAKの細胞効力の尺度を提供する。

50

【0149】

CD3+T細胞を、抗CD3抗体(Clone UCHT1、BD Biosciences)と結合したフィコエリスロビリン(PE)を使用して特定し、一方、Alexa Fluor 647結合抗pSTAT6抗体(pY641、Clone 18/P、BD Biosciences)を使用してSTAT6リン酸化を検出した。

【0150】

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、アッセイ3および4と同様に健康なドナーのヒト全血から単離した。細胞を250,000細胞/ウェルで培地(200 μL)に播種し、1時間培養し、次に、様々な濃度の試験化合物を含有するアッセイ培地(50 μL)(0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ)、2 mM Glutamax、25 mM HEPESおよび1X PenStrepを補充した RPMI)中に再度懸濁させた。化合物をDMSOで段階希釈し、次にアッセイ培地でさらに500倍(最終アッセイ濃度の2倍)に希釈した。試験化合物(50 μL)を細胞とともに37、5%CO₂で1時間インキュベートし、続いて30分間予め温めたアッセイ培地にIL-4(50 μL)(R&D Systems;最終濃度20 ng/mL)を添加した。サイトカイン刺激の後、細胞を予め温めた固定液(100 μL)(BD Biosciences)で37、5%CO₂で10分間固定し、FACS緩衝液(1 mL)(DPBS中2%FBS)で2回洗浄し、氷冷Perm Buffer III(1000 μL)(BD Biosciences)中に4で30分間再度懸濁させた。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、次に抗CD3 PE(1:50希釈)および抗pSTAT6 Alexa Fluor 647(1:5希釈)を含有するFACS緩衝液(100 μL)中に暗所で室温で60分間再度懸濁させた。インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後に、LSRIIフローサイトメーター(BD Biosciences)を用いて分析した。

【0151】

IL-4に応答する試験化合物の阻害効力を決定するために、pSTAT6の蛍光強度中央値(MFI)をCD3+T細胞で測定した。IC₅₀値は、化合物濃度に対するMFIの阻害曲線の解析から決定した。データはpIC₅₀(10を底とする負の対数IC₅₀)として表される。化合物1はこのアッセイで8.1のpIC₅₀値を示した。

【0152】

アッセイ6：細胞JAK効力アッセイ：CD3+T細胞におけるIL-6刺激pSTAT3の阻害

アッセイ5のプロトコールに類似したプロトコールを使用して、インターロイケン-6(IL-6)で刺激したSTAT3のリン酸化の阻害についての試験化合物の効力を決定した。抗pSTAT3抗体(pY705、Clone 4/P、BD Biosciences)と結合したAlexa Fluor 647を使用してSTAT3リン酸化を検出した。

【0153】

化合物1はこのアッセイで7.4のpIC₅₀値を示した。

【0154】

アッセイ7：細胞JAK効力アッセイ：IFN誘導性pSTAT1の阻害

インターフェロンガンマ(IFN)で刺激したSTAT1のリン酸化の阻害についての試験化合物の効力を、フローサイトメトリーを用いてヒト全血(Stanford Blood Center)から単離したCD14陽性(CD14+)単球において測定した。IFNはJAKを通じてシグナルを伝達するので、このアッセイはJAKの細胞効力の尺度を提供する。

【0155】

単球を、抗CD14抗体(Clone RM052、Beckman Coulter)と結合したフルオレセインイソチオシアネート FITCを使用して特定し、Alexa Fluor 647結合抗pSTAT1抗体(pY701、Clone 4a、BD Biosciences)を使用してSTAT1リン酸化を検出した。

【0156】

10

20

30

40

50

ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を、フィコール密度勾配を用いて健康なドナーのヒト全血から単離した。細胞を、5% C O₂ 加湿インキュベーターにおいて、10% ウシ胎仔血清 (F B S、ライフテクノロジーズ)、2 mM G l u t a m a x (ライフテクノロジーズ)、25 mM H E P E S (ライフテクノロジーズ) および 1 X P e n / S t r e p (ライフテクノロジーズ) を補充した R P M I (ライフテクノロジーズ)、37° で培養した。細胞を 250,000 細胞 / ウエルで培地 (200 μL) に播種し、2 時間培養し、様々な濃度の試験化合物を含有するアッセイ培地 (50 μL) (0.1% ウシ血清アルブミン (シグマ)、2 mM G l u t a m a x、25 mM H E P E S および 1 X P e n s t r e p を補充した R P M I) 中に再度懸濁させた。化合物を D M S O で段階希釈し、次いで、最終 D M S O 濃度が 0.1% になるようにさらに培地で 1000 倍希釈した。試験化合物の希釈液を細胞とともに 37°、5% C O₂ で 1 時間インキュベートし、続いて最終濃度 0.6 ng / mL でアッセイ培地 (50 μL) に 30 分間予め温めた I F N (R & D S y s t e m s) を添加した。サイトカイン刺激の後、細胞を予め温めた固定液 (100 μL) (B D B i o s c i e n c e s) で 37°、5% C O₂ で 10 分間固定し、F A C S 緩衝液 (1 mL) (P B S 中 1% B S A) で 2 回洗浄し、1:10 抗 C D 14 F I T C : F A C S 緩衝液 (100 μL) 中に再度懸濁させ、4° で 15 分間インキュベートした。細胞を 1 回洗浄し、次に氷冷 P e r m B u f f e r I I I (B D B i o s c i e n c e s) (100 μL) 中に 4° で 30 分間再度懸濁させた。細胞を F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、次に 1:10 抗 p S T A T 1 A l e x a F l u o r 6 4 7 : F A C S 緩衝液 (100 μL) 中に暗所で室温で 30 分間再度懸濁させ、F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、L S R I I フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s) を用いて分析した。

【0157】

試験化合物の阻害効力を決定するために、p S T A T 1 の蛍光強度中央値 (M F I) を C D 14+ 単球で測定した。I C 50 値は、化合物濃度に対する M F I の阻害曲線の解析から決定した。データは p I C 50 (10 を底とする負の対数 I C 50) 値として表される。化合物 1 は、このアッセイで約 7.5 の p I C 50 値を示した。

【0158】

アッセイ 8：マウスの血漿および肺における薬物動態

試験化合物の血漿および肺レベルならびにその比率は、以下の方法で決定された。チャーレルズ・リバー・ラボラトリーズから入手した B A L B / c マウスをアッセイに使用した。試験化合物を、0.2 mg / mL の濃度で p H 4 クエン酸緩衝液中の 20% プロピレン glycol に個別に配合し、50 μL の投与溶液を経口吸引によりマウスの気管に導入した。投与後の様々な時点 (一般に 0.167、2、6、24 時間) に、血液試料を心臓穿刺により取り出し、無傷の肺をマウスから切除した。血液試料を 4° にて約 12,000 rpm で 4 分間遠心分離 (エッペンドルフ遠心分離機、5804 R) して血漿を収集した。肺をパッドで乾燥させ、秤量し、滅菌水に 1:3 に希釈してホモジナイズした。試験化合物の血漿および肺のレベルは、試験マトリックスの標準曲線に構築された分析標準に対する L C - M S 解析によって決定された。肺対血漿比は、肺 A U C (μ g h r / g) と血漿 A U C (μ g h r / mL) の比として決定された。この A U C は、慣習的に時間に対する試験化合物濃度の曲線下面積として定義されている。

【0159】

化合物 1 は、マウスにおいて、肺での曝露が血漿での曝露の約 5.5 倍大きいことを示した。

【0160】

アッセイ 9：肺組織における I L - 1 3 誘導性 p S T A T 6 誘導のネズミ (マウス) モデル I L - 1 3 は喘息の病態生理学の基礎となる重要なサイトカインである (K u d l a c z ら、E u r . J . P h a r m a c o l , 2 0 0 8 , 5 8 2 , 1 5 4 - 1 6 1)。I L - 1 3 は、キナーゼのヤヌスファミリー (J A K) のメンバーを活性化する細胞表面受容体に結合し、それは次に S T A T 6 をリン酸化し、その後転写経路をさらに活性化する。記載されるモデルでは、I L - 1 3 の用量をマウスの肺に局所送達して S T A T 6 のリン酸化

10

20

30

40

50

(pSTAT6)を誘導し、次にこれをエンドポイントとして測定した。

【0161】

ハーランから入手した成体BALB/cマウスをアッセイに使用した。試験当日、動物をイソフルランで軽く麻酔し、ビヒクルまたは試験化合物(0.5mg/ml、数回の呼吸で総体積50μL)を経口吸引で投与した。動物を投与後横臥位に置き、麻酔から完全に回復するのをモニターした後、ホームケージに戻した。数時間後、動物を再度短時間麻酔し、経口吸引によりビヒクルまたはIL-13のいずれか(送達された総用量0.03μg、総体積50μL)を負荷した後、麻酔から完全に回復するのをモニターしてホームケージに戻した。ビヒクルまたはIL-13投与の1時間後、抗pSTAT6 E L I S A(ウサギmAb捕捉/コーティング抗体；マウスマAb検出/レポート抗体：抗pSTAT6-pY641；二次抗体：抗マウスIgG-HRP)を使用する両方のpSTAT6検出のために胚を収集し、上記のアッセイ12で記載されるように、総薬物濃度について分析した。

10

【0162】

モデルの活性は、ビヒクルで処置されてIL-13を負荷された対照動物と比較した、5時間で処置動物の肺に存在するpSTAT6のレベルの低下によって証明される。ビヒクルで処置されてIL-13を負荷された対照動物と、ビヒクルで処置されてビヒクルを負荷された対照動物の違いは、任意の所与実験においてそれぞれ0%および100%の阻害効果となった。化合物1は、IL-13負荷後4時間でSTAT6リン酸化を約60%阻害した。

20

【0163】

アッセイ10：肺のアルテルナリア・アルテナータ誘導性好酸球性炎症のネズミモデル
気道好酸球増加症は、ヒトの喘息の特徴である。アルテルナリア・アルテナータは、ヒトにおいて喘息を悪化させ、マウスの肺において好酸球性炎症を誘発する真菌のエアロアレルゲンである。(Havauxら、Clin Exp Immunol. 2005, 139(2): 179-88)。マウスにおいて、アルテルナリアが肺において組織常在性2型自然リンパ球系細胞を間接的に活性化し、この細胞がJAK依存性サイトカインに応答し(例えば、IL-2およびIL-7)、放出し(例えば、IL-5およびIL-13)、好酸球性炎症を調整することが実証されている(Bartemesら、J Immunol. 2012, 188(3): 1503-13)。

30

【0164】

Taconicより入手した7~9週齢の雄C57マウスを試験に使用した。試験当日、動物をイソフルランで軽く麻酔し、ビヒクルまたは試験化合物(0.1~1.0mg/ml、数回の呼吸で総体積50μL)を中咽頭吸引で投与した。動物を投与後横臥位に置き、麻酔から完全に回復するのをモニターした後、ホームケージに戻した。1時間後、動物を再度短時間麻酔し、ビヒクルまたはアルテルナリア抽出物(送達された総抽出物200μg、総体積50μL)を中咽頭吸引で負荷した後、麻酔から完全に回復するのをモニターしてホームケージに戻した。アルテルナリア投与の48時間後、気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、Advia 120 Hematology System(Siemens)を使用してBALF中の好酸球を計数した。

40

【0165】

モデルの活性は、ビヒクルで処置されてアルテルナリアを負荷された対照動物と比較し、48時間の時点で処置動物のBALFに存在する好酸球のレベルの低下によって証明される。データは、ビヒクルで処置されてアルテルナリアを負荷されたBALF好酸球の応答の阻害パーセントとして表される。阻害パーセントを計算するため、各条件のBALF好酸球の数を、平均ビヒクル処置アルテルナリア負荷BALF好酸球のパーセントに変換し、100パーセントから引いた。化合物1は、アルテルナリア負荷の48時間後にBALF好酸球数の約88%の阻害を示した。

【0166】

アッセイ11：肺モデルのLPS/G-CSF/IL-6/IFN カクテル誘導性気道

50

好中球性炎症のネズミモデル

気道の好中球増加は、ヒトの一連の呼吸器疾患の特徴である。気道の好中球増加症を誘導するためにLPS/G-CSF/IL-6/IFN カクテルを使用して好中球性気道炎症のモデルで化合物1を試験した。

【0167】

ジャクソン研究所から入手した7～9週齢の雄Balb/C(野生型)マウスを試験に使用した。試験当日、動物をイソフルランで軽く麻酔し、ビヒクルまたは試験化合物(1.0mg/ml、数回の呼吸で総体積50μL)を中咽頭吸引で投与した。動物を投与後横臥位に置き、麻酔から完全に回復するのをモニターした後、ホームケージに戻した。1時間後、動物を再度短時間麻酔し、ビヒクルまたはLPS; 0.01mg/kg/G-CSF; 5μg/IL-6; 5μg/IFN; 5μg(総体積100μL)を中咽頭吸引(0A)によって負荷した。LPS/G-CSF/IL-6/IFNgカクテル投与の24時間後、気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、好中球を計数した。

10

【0168】

化合物1による0A処置で、気道好中球の統計学的に有意な減少が見られ(ビヒクル処置マウスに対して84%)、JAK依存性シグナル伝達の遮断が好中球性気道炎症に効果があることが実証された。

【0169】

アッセイ12：ウサギの目における眼内薬物動態

このアッセイの目的は、ウサギ眼組織における化合物1の薬物動態を決定することであった。

20

【0170】

溶液製剤

本発明の化合物、5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノール(1)を、4mg/mlの標的濃度を達成するように10%2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンに溶解させるか、または1mg/mlの標的濃度を達成するように精製水に溶解させた。試験化合物溶液の両眼硝子体内注射(50μL/目)を、シクロデキストリンおよび水ビヒクル製剤のそれぞれについて、2用量群(それぞれ200μg/目および50μg/目)のニュージーランド白色ウサギに投与した。試験化合物濃度は、注射後の所定の時点(30分、4時間、1日、3日、7日、14日)に眼組織：硝子体、房水、網膜/脈絡膜および虹彩-毛様体で測定した。2匹のウサギ(4個の目)に各時点で投与した。硝子体組織において、化合物1は、約12時間の半減期の初期濃度低下と最後に約3.6日の終末相半減期を特徴とする2相の濃度の低下を示した。この化合物は、網膜および脈絡膜領域にも迅速に分配されることが見出され、硝子体組織と同様の薬物動態プロファイルを示す。

30

【0171】

懸濁液製剤

懸濁液製剤は、10mg/mlの標的濃度を達成するように、実施例2の結晶性化合物1と0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC E5)+0.02%Tween 80を組み合わせることによって調製した。試験化合物の懸濁液の両眼硝子体内注射(50μL/目)を、ニュージーランド白色ウサギに投与した(500μg/目)。試験化合物濃度は、注射後30分、2週間、4週間、6週間、および8週間に懸濁液製剤アッセイと同様に眼組織で測定した。化合物は、約3μg/ml/日のクリアランス速度で、30分から6週間まで硝子体の薬物濃度の直線的な低下を示した。この挙動は、化合物1のビヒクルへの溶解度および溶液製剤における眼の薬物動態挙動と一致している。血漿中の薬物濃度を測定し、この濃度が硝子体組織の濃度よりも少なくとも3桁低いことが見出された。

40

【0172】

アッセイ13：薬力学的アッセイ：ラットにおけるIL-6誘導性pSTAT3の阻害

50

I L - 6 誘導性 p S T A T 3 を阻害する試験化合物の単回硝子体内投与の能力を、ラット網膜 / 脈絡膜ホモジネートにおいて測定した。

【 0 1 7 3 】

懸濁液製剤は、3 m g / m L および 1 0 m g / m L の標的濃度を達成するように、実施例 2 の結晶性化合物 1 と 0 . 5 % ヒドロキシプロピルメチルセルロース (H P M C E 5 L V)、0 . 0 2 % Tween 8 0 、および 0 . 9 % 塩化ナトリウムを精製水中で組み合わせることによって調製した。

【 0 1 7 4 】

雌 Lewis ラットに懸濁液製剤または薬物ビヒクルを硝子体内 (I V T) 投与した (5 μ L / 目)。3 日後、I L - 6 (P e p r o t e c h ; 0 . 1 m g / m L ; 5 μ L / 目) またはビヒクルを硝子体内投与して p S T A T 3 を誘導した。眼組織を、I L - 6 を用いる 2 回目の I V T 注射の 1 時間後に解剖した。網膜 / 脈絡膜組織をホモジナイズし、E L I S A (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y) を用いて p S T A T 3 レベルを測定した。I L - 6 誘導性 p S T A T 3 の阻害パーセントを、ビヒクル / ビヒクルおよびビヒクル / I L - 6 群と比較して計算した。1 0 0 % を超える阻害は、ビヒクル / ビヒクル群で観察されたレベルを下回る p S T A T 3 レベルの低下を反映している。

【 0 1 7 5 】

I L - 6 負荷の前の 3 日の前処置により、懸濁液製剤によって投与された 1 5 μ g 用量と 5 0 μ g 用量の本発明の化合物は、I L - 6 誘導性 p S T A T 3 を、網膜 / 脈絡膜組織においてそれぞれ 3 3 % および 1 0 9 % 阻害した。

【 0 1 7 6 】

アッセイ 1 4 : 薬力学的アッセイ : ウサギにおける I F N 誘導性 I P - 1 0 の阻害
インターフェロン - ガンマ (I F N) 誘導性 I P - 1 0 タンパク質レベルを阻害する単回硝子体内投与の能力を、ウサギ硝子体および網膜 / 脈絡膜組織において測定した。

【 0 1 7 7 】

実施例 2 の化合物 1 の 1 m g / m L および 4 m g / m L の濃度の溶液製剤を、アッセイ 1 2 と同様に調製した。懸濁液製剤は、2 0 m g / m L の標的濃度を達成するように、実施例 2 の結晶性化合物 1 と 0 . 5 % ヒドロキシプロピルメチルセルロース (H P M C E 5)、0 . 0 2 % Tween 8 0 、および 9 m g / m L 塩化ナトリウムを精製水中で組み合わせることによって調製した。

【 0 1 7 8 】

雄のニュージーランド白色ウサギ (L i v e o n B i o l a b s 、インド) を試験に使用した。動物を、研究施設 (J u b i l a n t B i o s y s L t d . インド) に到着後に順応させた。各ウサギに、5 0 μ L / 目の総投与量で合計 2 回の硝子体内 (I V T) 注射を投与した。最初の I V T 注射 (4 5 μ L / 目) は、規定の時点 (すなわち溶液製剤には 2 4 時間、懸濁液製剤には 1 週間) に試験化合物またはビヒクルを送達した。2 回目の I V T 注射 (5 μ L / 目) は、I P - 1 0 の誘導のために I F N (1 μ g / 目 ; 保存溶液 1 m g / m L ; K i n g f i s h e r B i o t e c h) またはビヒクルを送達した。手短に言えば、注射当日に、ウサギをケタミン (3 5 m g / k g) およびキシラジン (5 m g / k g) の筋肉注射によって麻酔した。深く麻酔がかかったら、それぞれの目を滅菌生理食塩水ですすぎ、B r a u n s t e i n 固定キャリパー (2 3 / 4 ") で直筋から 3 . 5 m m 、縁から 4 m m の位置にマークを付けることによって両目の鼻上側に、3 1 ゲージ針を有する 0 . 5 m L インスリンシリンジ (5 0 単位 = 0 . 5 m L) を使用して I V T 注射を行った。

【 0 1 7 9 】

組織を、I F N を用いる 2 回目の I V T 注射の 2 4 時間に回収した。硝子体液 (V H) および網膜 / 脈絡膜組織 (R / C) を回収し、ホモジナイズし、ウサギ C X C L 1 0 (I P - 1 0) E L I S A キット (K i n g f i s h e r B i o t e c h) を使用して I P - 1 0 タンパク質レベルを測定した。I F N 誘導性 I P - 1 0 の阻害パーセントを、ビヒクル / ビヒクルおよびビヒクル / I F N 群と比較して計算した。

10

20

30

40

50

【0180】

溶液として投与した場合、IFN 負荷の前の24時間の前処置で、45 μg の化合物1は、IFN 誘導性IP-10を硝子体液および網膜/脈絡膜組織においてそれぞれ70%および86%阻害し、一方、180 μg の化合物は、IFN 誘導性IP-10を硝子体液および網膜/脈絡膜組織においてそれぞれ91%および100%阻害した。

【0181】

IFN 負荷の前の1週間の前処置により、化合物1の結晶性懸濁液製剤は、IFN 誘導性IP-10を硝子体液および網膜/脈絡膜組織の両方で100%阻害した。

【0182】

アッセイ15：ヒト3D気道培養におけるIFN およびIL-27誘導性ケモカインCXCL9およびCXCL10の阻害

Epithelial组织培養をMattekから入手した(AIR-100)。培養物は喘息ドナーから得られたものであった。細胞培養インサートにおいて、ヒト由来気管/気管支上皮細胞を多孔質膜支持体上で増殖および分化させ、細胞の下の温められた培地と上の気体の試験雰囲気を有する気液界面を可能にした。組織を37、5%CO₂加湿インキュベーター内の維持培地(Mattek、AIR-100-MM)で培養した。4つのドナーを試験した。0日目に、組織培養を10 μM、1 μMおよび/または0.1 μMの試験化合物で処理した。化合物をジメチルスルホキシド(DMSO、シグマ)に希釈して最終濃度0.1%とした。0.1%のDMSOをビヒクル対照として使用した。試験化合物を培養物とともに5%CO₂、37で1時間インキュベートした、続いて最終濃度100 ng/mlのIFN (R&D Systems)またはIL-27 (R&D Systems)を含有する、予め温めた培地を添加した。組織培養を8日間維持した。培地は2日おきに化合物およびIFN またはIL-27を含有する新鮮な培地と交換した。8日目に、組織培養および上清を分析のために回収した。上清試料を、CXCL10 (IP-10) およびCXCL9 (MIG) についてluminex分析(EMD Millipore)を使用してアッセイした。データは阻害% +/- 標準偏差(±STDV)として表される。阻害パーセントは、ビヒクル処理細胞と比較した、IFN またはIL-27誘導性CXCL10またはCXCL9分泌に対する化合物阻害効力によって決定した。データは3または4つのドナーの平均である。化合物1は、ビヒクル対照と比較した場合に、IFN 誘導性CXCL10分泌を99% ± 2.0 (10 μMで)、71% ± 19 (μMで) および17% ± 12 (0.1 μMで) 阻害できた。化合物1は、ビヒクル対照と比較した場合に、IFN 誘導性CXCL9分泌を100% ± 0.3 (10 μMで)、99% ± 0.9 (1 μMで) および74% ± 17 (0.1 μMで) 阻害できた。化合物1は、ビヒクル対照と比較した場合に、IL-27誘導性CXCL10分泌を108% ± 11 (10 μMで)、98% ± 10 (1 μMで) および73% ± 8.5 (0.1 μMで) 阻害できた。化合物1は、ビヒクル対照と比較した場合に、IL-27誘導性CXCL9分泌を100% ± 0 (10 μMで)、95% ± 3.7 (1 μMで) および75% ± 3.5 (0.1 μMで) 阻害できた。

【0183】

アッセイ16：IL-5媒介性好酸球生存アッセイ

IL-5媒介性好酸球の生存に対する試験化合物の効力を、ヒト全血から単離したヒト好酸球(ALL Cells)で測定した。IL-5はJAKを通じてシグナルを伝達するので、このアッセイはJAKの細胞効力の尺度を提供する。

【0184】

ヒト好酸球を、健康なドナーの新鮮なヒト全血(ALL Cells)から単離した。血液を0.9%塩化ナトリウム溶液(シグマ-アルドリッヂ)中4.5%デキストラン(シグマ-アルドリッヂ)と混合した。赤血球を35分間沈降させた。白血球に富む上層を取り出し、フィコール-Paque (GEヘルスケア)の上で層状にし、600gで30分間遠心分離した。血漿および単核細胞層を取り出した後、顆粒球層を水で溶解させ、混入している赤血球を取り出した。ヒト好酸球単離キット(Miltenyi Biotech)

10

20

30

40

50

を使用して好酸球をさらに精製した。精製された好酸球の一部を抗CD16 FITC (Miltenyi Biotec)とともに暗所で4℃で10分間とともにインキュベートした。LSRIIフローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して純度を分析した。

【0185】

細胞を、5%CO₂加湿インキュベーターにおいて、10%熱失活ウシ胎仔血清1640(FBS、ライフテクノロジーズ)、2mM Glutamax(ライフテクノロジーズ)、25mM HEPES(ライフテクノロジーズ)および1X Pen/Strep(ライフテクノロジーズ)を補充した RPMI(ライフテクノロジーズ)、37℃で培養した。細胞を10,000細胞/ウェルで培地(50μL)に播種した。プレートを300gで5分間遠心分離し、上清を除去した。化合物をDMSOで段階希釈し、次に培地でさらに500倍に希釈して最終アッセイ濃度の2倍とした。試験化合物(50μL/ウェル)を細胞に添加し、37℃、5%CO₂で1時間インキュベートし、続いて72時間予め温めた培地(50μL)にIL-5(R&D Systems; 最終濃度1ng/mLおよび10pg/mL)を添加した。

【0186】

サイトカイン刺激後、細胞を300gで5分間遠心分離し、冷DPBS(ライフテクノロジーズ)で2回洗浄した。生存力およびアポトーシスを評価するために、細胞をヨウ化プロピジウム(Thermo Fisher Scientific)およびAPC Annexin V(BD Biosciences)とともにインキュベートし、LSRIIフローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して分析した。IC₅₀値は、化合物濃度に対する細胞生存率パーセントの生存率曲線の解析から決定した。データはpIC₅₀(10を底とする負の対数IC₅₀)値として表される。化合物1は、10pg/mLのIL-5の存在下で7.9±0.5のpIC₅₀値、および1ng/mLのIL-5の存在下で6.5±0.2のpIC₅₀値を示した。

【0187】

本発明はその特定の態様または実施形態を参照して説明されたが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更を行うことができ、または等価物を置き換えることができることを当業者は理解するであろう。さらに、適用され得る特許法および規制によって許可される範囲内で、本明細書に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、それぞれの文書が参照によって個別に本明細書に組み込まれると同程度に、その全文が参照によって本明細書に組み込まれる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

5-エチル-2-フルオロ-4-(3-(5-(1-メチルピペリジン-4-イル)-4-, 5, 6, 7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4, 5-c]ピリジン-2-イル)-1H-インダゾール-6-イル)フェノールのシュウ酸塩の結晶性水和物。

(項目2)

前記結晶性シュウ酸塩水和物が、6.77±0.20、12.13±0.20、13.54±0.20、17.23±0.20、および18.00±0.20の2値における回折ピークを含む粉末X線回折パターンを特徴とする、項目1に記載の結晶性シュウ酸塩水和物。

(項目3)

前記粉末X線回折パターンが、11.56±0.20、14.29±0.20、19.51±0.20、21.38±0.20、および23.63±0.20から選択される、2値における2つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有することをさらに特徴とする、項目2に記載の結晶性シュウ酸塩水和物。

(項目4)

前記結晶性シュウ酸塩水和物は、前記ピーク位置が図1に示されるパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末X線回折パターンを特徴とする、項目1に記載の結晶性シュウ酸

10

20

30

40

50

塩水和物。

(項目 5)

前記結晶性シウ酸塩水和物が、266 ~ 276 の温度で吸熱熱流の最大値を示す、10 / 分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目1に記載の結晶性シウ酸塩水和物。

(項目 6)

前記結晶性シウ酸塩水和物が、図2に示される示差走査熱量測定トレースと実質的に一致する示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目1に記載の結晶性シウ酸塩水和物。

(項目 7)

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのコハク酸塩の結晶性水和物。

10

(項目 8)

前記結晶性コハク酸塩水和物が、4.81 ± 0.20, 9.66 ± 0.20, 14.93 ± 0.20、および 16.78 ± 0.20 の 2 値における回折ピークを含む粉末X線回折パターンを特徴とする、項目7に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

(項目 9)

前記粉末X線回折パターンが、10.46 ± 0.20, 16.21 ± 0.20, 17.45 ± 0.20, 22.87 ± 0.20、および 24.77 ± 0.20 から選択される、2 値における 2 つまたはそれより多くのさらなる回折ピークを有することをさらに特徴とする、項目8に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

20

(項目 10)

前記結晶性コハク酸塩水和物は、前記ピーク位置が図5に示されるパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末X線回折パターンを特徴とする、項目7に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

(項目 11)

前記結晶性コハク酸塩水和物が、180 ~ 190 の温度で吸熱熱流の最大値を示す、10 / 分の加熱速度で記録された示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目7に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

30

(項目 12)

前記結晶性コハク酸塩水和物が、図6に示される示差走査熱量測定トレースと実質的に一致する示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目7に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

(項目 13)

項目1 ~ 6 のいずれか一項に記載の結晶性シウ酸塩水和物または項目7 ~ 12 のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物と薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬組成物。

(項目 14)

5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4 - 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノールのシウ酸塩の結晶性水和物を調製する方法であって、前記方法が、

40

(a) 5 - エチル - 2 - フルオロ - 4 - (3 - (5 - (1 - メチルピペリジン - 4 - イル) - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1H - イミダゾ [4, 5 - c] ピリジン - 2 - イル) - 1H - インダゾール - 6 - イル) フェノール：シウ酸の 1 : 1 混合物をテトラヒドロフラン：水の 1 : 1 混合物に室温で溶解させることと、

(b) テトラヒドロフラン：水：アセトニトリルの 1 : 1 : 2 混合物を添加して懸濁液を生成することと、

(c) 前記懸濁液を約 1 日間攪拌することと、

(d) 前記懸濁液から前記シウ酸塩の前記結晶性水和物を単離することを含む、方法。

50

(項目 15)

哺乳動物において呼吸器疾患を処置する方法であって、前記方法が、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物と薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物を前記哺乳動物に投与することを含む、方法。

(項目 16)

前記呼吸器疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、囊胞性線維症、間質性肺炎、特発性肺線維症、急性肺傷害、急性呼吸窮迫症状群、気管支炎、気腫または閉塞性細気管支炎である、項目15に記載の方法。

(項目 17)

前記呼吸器疾患が閉塞性細気管支炎である、項目15に記載の方法。

10

(項目 18)

前記呼吸器疾患が喘息または慢性閉塞性肺疾患である、項目15に記載の方法。

(項目 19)

前記呼吸器疾患が喘息である、項目18に記載の方法。

(項目 20)

前記医薬組成物が吸入によって投与される、項目15に記載の方法。

(項目 21)

前記呼吸器疾患が、肺感染症、蠕虫感染症、肺動脈性肺高血圧症、サルコイドーシス、リンパ脈管筋腫症、気管支拡張症、または浸潤性肺疾患である、項目15に記載の方法。

20

(項目 22)

前記呼吸器疾患が、薬物誘導性間質性肺炎、真菌誘導性間質性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、過敏性肺炎、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、特発性急性好酸球性肺炎、特発性慢性好酸球性肺炎、好酸球増加症状群、レフレル症状群、閉塞性細気管支炎性器質化肺炎、または免疫チェックポイント阻害剤誘発性間質性肺炎である、項目15に記載の方法。

(項目 23)

哺乳動物における呼吸器疾患の処置において使用するための、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

30

(項目 24)

哺乳動物における呼吸器疾患の処置のための医薬の製造における、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物の使用。

(項目 25)

哺乳動物において眼疾患を処置する方法であって、前記方法が、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物と薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物を前記哺乳動物の眼に投与することを含む、方法。

40

(項目 26)

哺乳動物における眼疾患の処置において使用するための、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物。

(項目 27)

哺乳動物における眼疾患の処置のための医薬の製造における、項目1～6のいずれか一項に記載の結晶性シュウ酸塩水和物または項目7～12のいずれか一項に記載の結晶性コハク酸塩水和物の使用。

50

【図面】

【図 1】

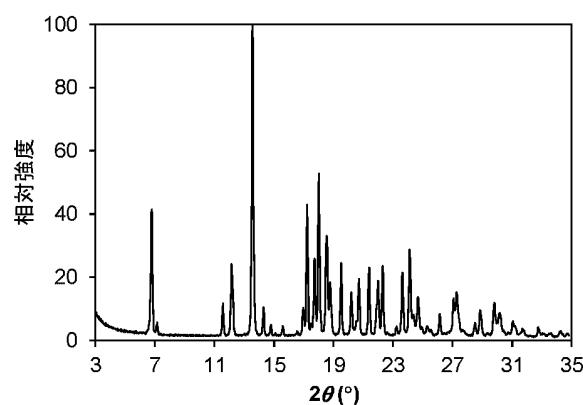


FIG. 1

【図 2】

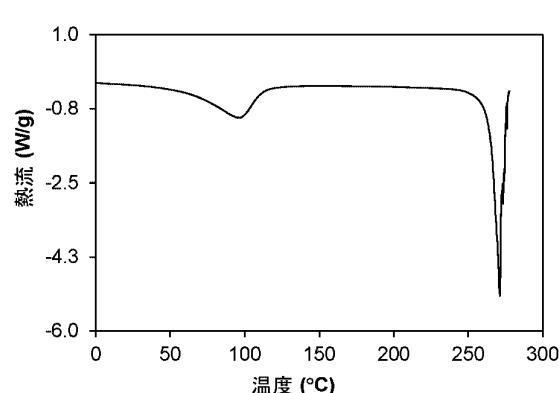


FIG. 2

【図 3】

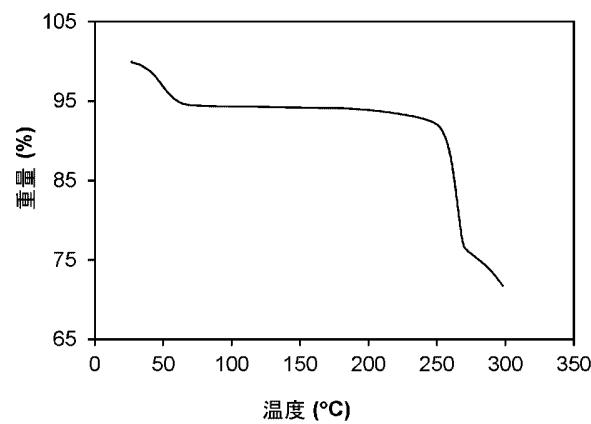


FIG. 3

【図 4】

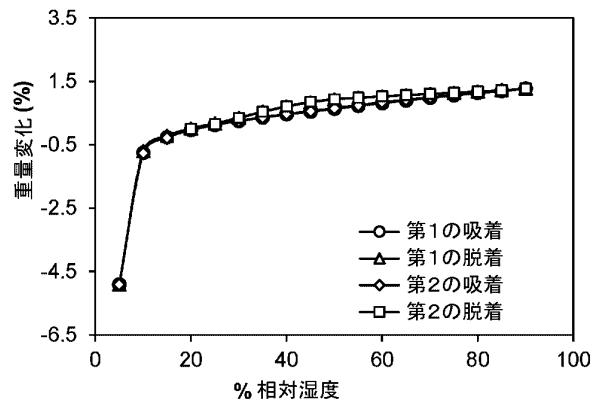


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

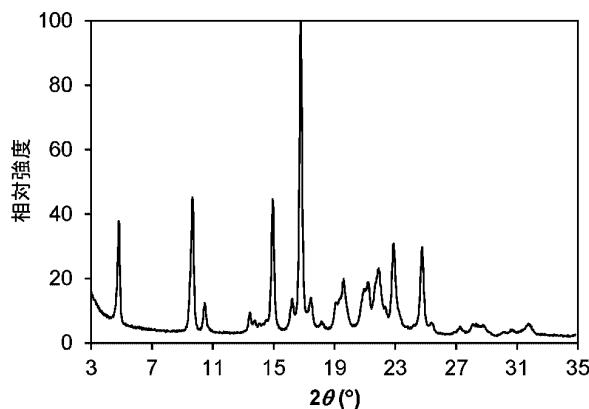


FIG. 5

【図 6】

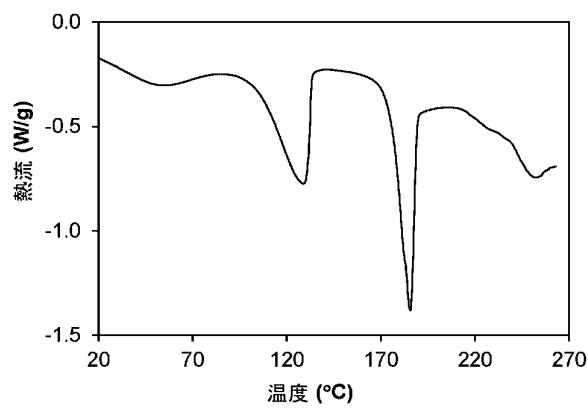


FIG. 6

【図 7】

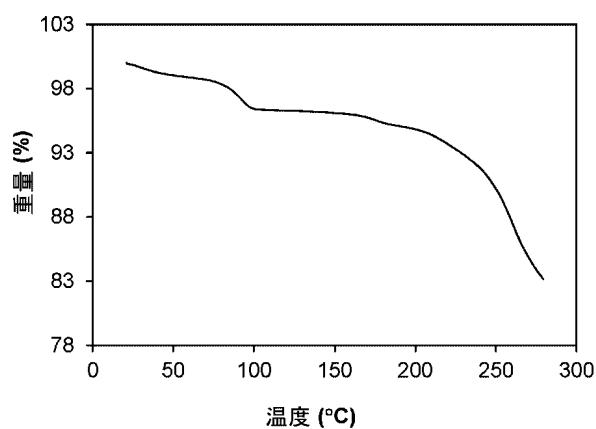


FIG. 7

【図 8】

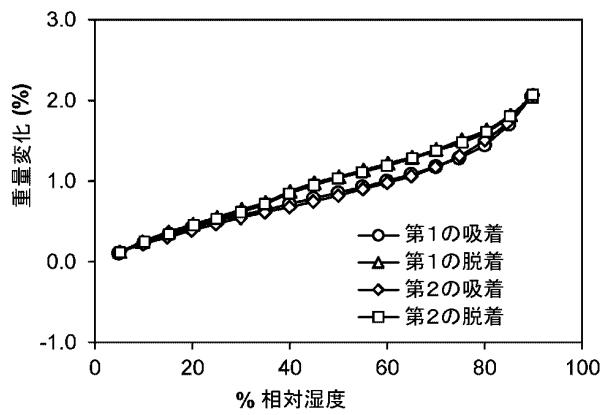


FIG. 8

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P 33/10 (2006.01)	A 6 1 P 33/10
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダブロス, マータ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, フォスター シティ ブールバード 888, アパートメント キュー2

(72)発明者 サラディー, ヴェンカット アール.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, フォスター シティ ブールバード 888, アパートメント イー3

(72)発明者 ゼレム, ジェリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ウッズ サークル 29

(72)発明者 クラインシェック, メラニー エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サンフランシスコ, エリザベス ストリート 30

(72)発明者 クレーター, グレン ディー.

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27612, ローリー, リップリング ストーン レーン 7
108

審査官 西澤 龍彦

(56)参考文献 特表2018-531982 (JP, A)

特表2014-522865 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 07 D

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)