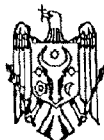




MD/EP 3555097 T2 2022.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3555097 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 471/14 (2006.01.01)
A61K 31/437 (2006.01.01)
A61P 29/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 1212 (22) Data de depozit: 2017.12.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17854175.1, 2017.12.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3555097, 2019.10.23 (31) Numărul cererii prioritare: 201662435609 P; 201762592680 P; 201762596607 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.12.16; 2017.11.30; 2017.12.08 (33) Țara cererii prioritare: US; US; US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2022, 2022.12.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 24/2022, 2022.06.15 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31
(71) Solicitant: JANSSEN PHARMACEUTICA NV, BE (72) Inventatori: KOUDRIAKOVA Tatiana, US; KREUTTER Kevin D., US; LEONARD Kristi, US; RIZZOLIO Michele C., US; SMITH Russell C., US; TICHENOR Mark S., US; WANG Aihua, US (73) Titular: JANSSEN PHARMACEUTICA NV, BE (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compuși imidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridină ca inhibitori ai kinazelor
Janus

(57) Rezumat:

1
Compuși 2-((1r,4r)-4-(imidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril, compoziții farmaceutice care îi conțin, metode de producere a acestora, și metode de utilizare a acestora incluzând metode pentru tratarea stărilor, tulburărilor, și

2
afecțiunilor mediate de JAK, cum ar fi boala inflamatorie intestinală.
Revendicări: 13
Figuri: 6

MD/EP 3555097 T2 2022.12.31

(54) Imidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridine compounds as inhibitors of Janus kinases

(57) Abstract:

1
2-((1r,4r)-4-(imidazo[4,5-d]pyrrolo[2,3-b]pyridin-1(6H)-yl)cyclohexyl)acetonitrile compounds, pharmaceutical compositions containing them, methods of making them, and methods of using them including methods for treating

2
disease states, disorders, and conditions mediated by JAK, such as inflammatory bowel disease.

Claims: 13

Fig.: 6

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

5 Prezentă invenție se referă la anumiți compuși imidazopiridină și compoziții farmaceutice care îi conțin.

FUNDAL

Factorii interni, factorii externi sau o combinație a ambilor factori poate declanșa sau poate fi asociată cu dezvoltarea de răspunsuri imune anormale în corp. În consecință, se dezvoltă stări patologice în care constituenții, cum ar fi substanțele și țesuturile, care sunt în mod normal prezente în corp sunt supuși la un astfel de răspuns imun. Aceste stări sunt cele la care se face referire generic ca boli ale sistemului imunitar. Deoarece sistemul imunitar al corpului este implicat și deteriorarea afectează țesutul corporal, astfel de boli sunt la cele la care se face referire de asemenea ca boli autoimune. Deoarece un astfel de sistem și țesut sunt o parte din același corp, termenii „boală autoimună” și „boală a sistemului imunitar” sunt utilizați aici interschimbabil, indiferent de ce declanșează răspunsul anormal al sistemului imunitar. Mai mult, identitatea sau mecanismul reliefării problemei imune nu este întotdeauna clar. Vezi, de exemplu, D.J. Marks, și colab., Crohn's disease: An immune deficiency state, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 38(1), 20-30 (2010); J.D. Lalande, și colab., Mycobacteria in Crohn's disease: How innate immune deficiency may result in chronic inflammation, *Expert Reviews of Clinical Immunology* 6(4), 633-41 (2010); J.K. Yamamoto-Furusho, și colab., Crohn's disease: Innate immunodeficiency, *World Journal of Gastroenterology*, 12(42), 6751-55 (2006). Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „boală autoimună” nu exclude afecțiuni ale căror cauze cuprind factori sau agenți externi, cum ar fi factori din mediu sau bacterieni, și factori interni cum ar fi susceptibilitatea genetică. Corespunzător, o afecțiune cum ar fi boala Crohn (CD) este referită aici ca o boală autoimună, indiferent dacă este declanșată de corpul însuși sau de factorii externi. Vezi, de exemplu, J. L. Casanova, și colab., Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages, *J. Exp. Med.* 206(9), 1839-43 (2009).

Dintre diferitele efecte adverse cauzate de bolile autoimune, cel puțin unul dintre următoarele este de obicei observat: deteriorarea, și uneori distrugerea, țesuturilor, și alterarea organelor care poate impacta creșterea organului și funcționarea organului. Exemplele de boli autoimune afectează majoritatea organelor majore, glandelor endocrine și exocrine, sângele și mușchii, și o multitudine de sisteme, cum ar fi sistemul digestiv, vascular, conectiv și nervos. Tratamentele imunosupresive sunt adesea adoptate pentru a trata bolile autoimune.

Sunt cunoscute mai multe teorii pentru a explica cum apar bolile autoimune, unele concentrându-se pe factorii endogeni și altele incluzând de asemenea factorii exogeni. La nivel molecular, traductorul și activatorul de Kinază Janus/semnal (JAK/STAT) al transcripției căii de semnalizare este considerat că joacă un rol important în transmiterea informației de la semnalele chimice extracelulare la nucleele celulare conducând la reglarea genelor care sunt implicate în activități celulare cum ar fi imunitatea. Citokinele sunt un exemplu al unei molecule extracelulare care joacă un rol important în semnalizarea celulară. Leucocitele cum ar fi neutrofilele sunt recrutate de citokine și chemokine pentru a cauza în final deteriorarea țesutului în bolile inflamatorii cronice.

Familia Kinază Janus (JAK) de proteine constă din 4 tirozin kinaze, JAK1, JAK2, JAK3 și Tyk2, care sunt centrale pentru semnalizarea intracelulară a receptorilor de citokine de tip I și de tip II. Termenul JAK se referă fie la JAK1, JAK2, JAK3 sau Tyk2, sau fie la orice combinație a acestora. Fiecare JAK se asociază selectiv cu subunități receptoare care dimerizează (sau multimerizează) pentru a forma receptori funcționali. În conformitate cu J.D. Clark, și colab., Discovery și Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases, *J. Med. Chem.* 57(12), 5023-38 (2014), „etapa de activare are loc când o citokină se leagă la receptorul său, inducând o multimerizare (dimerizare sau complexi de ordin superior) a subunităților receptoare. Acest lucru aduce JAK-urile asociate cu fiecare subunitate proximal unul cu celălalt, declanșând o serie de evenimente de fosforilare care conduc în final la fosforilarea și activarea proteinelor traductoare de semnal și activatoare de transcripție (STAT). Un dimer STAT fosforilat se translocă apoi la nucleul celulei unde el se leagă la genele țintă modulând expresia acestora”. Odată în nucleu, STAT-urile reglează transcripția genei numeroșilor mediatori în procesul inflamator prin legarea la situsurile de recunoaștere specifice pe ADN. Vezi, de exemplu, *J. Med. Chem.* 57(12), 5023-38 (2014), citată mai sus. Există dovezi considerabile care demonstrează importanța căii JAK/STAT în bolile inflamatorii, autoimune și cancer. Vezi, de exemplu, M. Coskun, și colab., Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013); și J.J. O'Shea, și colab., JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer, *The New England Journal of Medicine* 368, 161-70 (2013).

Bolile inflamatorii intestinale, incluzând boala Crohn și colita ulcerativă (UC), sunt caracterizate prin inflamația intestinală recurentă, întreruperea barierei epiteliale și disbioză microbiană. Răspunsul inflamator excesiv în tractul gastrointestinal este mediat de câteva citokine pro-inflamatorii incluzând TNF α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-21, și IL-23 care exercită efectele lor asupra celulelor sistemului imunitar nativ și adaptiv incluzând limfocite T și B, celule epiteliale, macrofage și celule dendritice (DC). Vezi, de exemplu, *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013), citată mai sus; S. Danese, și colab., JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: A hub for multiple inflammatory cytokines, *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* 310, G155-62 (2016); și M.F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Immunology* 14, 329-42 (2014).

Prevenirea și/sau controlul unui astfel de răspuns inflamator excesiv este de dorit. În lumina mecanismului unui astfel de răspuns cum s-a rezumat mai sus, inhibarea JAK (vezi ilustrarea din Fig. 1 în forma unei săgeți zimțate prezentând un inhibitor pan-JAK care lovește calea de semnalizare JAK/STAT și inflamația) este avut în vedere pentru a preveni sau controla răspunsul inflamator excesiv. Inhibitori ai JAK care inhibă o multitudine de astfel de proteine JAK, sunt referiți aici ca inhibitori pan-JAK. Exemple de beneficii terapeutice ale unei astfel de prevenirii sau control au fost văzute cu tofacitinib, un inhibitor pan-JAK biodisponibil oral aprobat în Statele Unite pentru tratamentul artritei reumatoide și în prezent în dezvoltare clinică pentru colita ulcerativă. Într-un studiu clinic de fază 2, 194 pacienți cu colită ulcerativă moderată până la severă au fost raportați evaluați pentru eficacitate clinică. Vezi, *de exemplu*, W.J. Sandborn, și colab., Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis, *The New England Journal of Medicine* 367, 616-24 (2012). Informația publicată pe baza acestui studiu indică faptul că pacienții care au primit de două ori pe zi (BID) doze de 0,5, 3, 10 și 15 mg au obținut rate de răspuns clinic de 32, 48, 61 și 78%, respectiv, în comparație cu 42% observat în placebo. S-a raportat în plus că obiectivul secundar al remisiei clinice (scor Mayo $\leq$ 2) a fost de 13, 33, 48 și 41% în comparație cu 10% observat la placebo. Vezi, *de exemplu*, *The New England Journal of Medicine* 367, 616-24 (2012), citat mai sus. Într-un studiu clinic de fază 3 UC, 88 din 476 pacienți au fost raportați că au obținut remisie clinică după 8 săptămâni de tratament cu tofacitinib (10 mg BID) în comparație cu 10 din 122 pacienți care au primit tratament cu placebo. Vezi W.J. Sandborn, și colab. Efficacy and safety of oral tofacitinib as induction therapy in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis: results from 2 phase 3 randomised controlled trials, *J. Crohns Colitis* 10, S15-S (2016). Rapoartele asupra bolii Crohn au indicat că tofacitinib a fost de asemenea în dezvoltarea pentru tratamentul CD; totuși, a fost raportat întrerupt din cauza eșecului de a obține eficacitate clinică într-un studiu clinic de 4 săptămâni/fază 2 pentru CD moderat până la sever. Vezi W.J. Sandborn, și colab., A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease, *Clinical gastroenterology and hepatology: The official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 12, 1485-93 e2 (2014). Pe baza consultării literaturii publice disponibile, este în prezent neclar dacă eșuarea tofacitinib în CD se referă la design-ul studiului clinic, diferențele mecaniciste între UC și CD sau evenimentele adverse sistemice care limitează doza. Vezi *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013), citată mai sus; *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 12, 1485-93 e2 (2014), citată mai sus; și C.J. Menet, și colab., Triazopyridines as selective JAK1 inhibitors: from hit identification to GLPG0634, *J. Med. Chem.* 57, 9323-42 (2014). În lumina caracteristicilor acestui inhibitor al JAK, este de dorit să se găsească inhibitori suplimentari ai JAK pentru prevenirea și/sau controlul răspunsului inflamator excesiv.

Evenimente adverse sistemice au fost raportate față de ambele studii clinice de fază 2 și fază 3 ale bolii inflamatorii intestinale (IBD) cu tofacitinib. Vezi *The New England Journal of Medicine* 367, 616-24 (2012), citat mai sus; *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 12, 1485-93 e2 (2014), citat mai sus; și J. Panes, și colab. Efficacy and safety of oral tofacitinib for induction therapy in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: results of Phase 2b randomised placebo-controlled trial, *J. Crohns Colitis* 10, S18-S19 (2016). Aceste evenimente adverse includ un număr absolut scăzut de neutrofile (ANC), colesterol total ridicat (lipide scăzute și cu densitate mare), perforare intestinală, și infecție. Astfel de evenimente adverse sunt consistente cu cele observate după tratamentul cu tofacitinib la pacienții cu artrită reumatoidă (RA) (vezi, de exemplu, J.M. Kremer, și colab. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo, *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009)), unele din care rezultă probabil fie din inhibarea dependentă de JAK2 a EPO, TPO și factorilor de stimulare a coloniilor (csf-2 și GM-CSF (factor de stimulare a coloniilor de granulocite macrofage)) și/sau fie din inhibarea dependentă de JAK1 a IL-6. Vezi, *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009), citată mai sus; și O.H. Nielsen, și colab., Will novel oral formulations change the management of inflammatory bowel disease? *Expert Opinion on Investigational Drugs* 25, 709-18 (2016).

Cu referire la Fig. 1, o medicație administrată oral poate urma în principiu tractul gastro-intestinal de la gură la esofag (1), la stomac (2) prin duoden (3) la jejun (4), apoi la ileum (5), și apoi la colon (6). Zonele de absorbție relative pentru astfel de părți diferite sunt de aproximativ 60% pentru jejun (4), de aproximativ 26% pentru ileum (5), și de aproximativ 13% pentru colon (6). Absorbția prin aceste diferite regiuni gastro-intestinale poate conduce la debutul distribuției sistemice care în schimb ar putea conduce la efecte secundare indezirabile. Tractul gastro-intestinal are o arie a suprafeței foarte mare. Vezi, de exemplu, H.F. Helander, și colab., Surface area of the digestive tract - revisited, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49(6), 681-89 (2014); și K.J. Filipski, și colab., Intestinal Targeting of Drugs: Rational Design Approaches and Challenges Current Topics in Medicinal Chemistry 13, 776-802 (2013). O astfel de arie a suprafeței de absorbție extensivă favorizează distribuția sistemică a substanțelor care pot trece prin pereții diferitelor părți ale tractului intestinal și în fluxul sanguin, și în schimb au potențialul de a conduce la efecte secundare nedorite ale unei substanțe distribuite sistemic. Distribuția sistemică este reprezentată prin săgeți cu linie întreruptă în Fig. 1 ca trecând prin pereții colonului în scopuri ilustrative simplificate, dar o astfel de distribuție nu este limitată la pereții colonului, pentru că ea poate avea loc de asemenea prin pereții altor părți ale tractului gastrointestinal prezentate în Fig. 1, cum ar fi cele ale intestinului subțire. Este de asemenea înțeles că săgeata cu linii punctate din Fig. 1 reprezintă distribuția sistemică dincolo de tractul gastrointestinal, ca atare se cunoaște că distribuția sistemică are loc cu referire la fiziologia tractului gastrointestinal, și că o astfel de săgeată cu linie întreruptă se referă simplu la o manieră ilustrativă schematică a unei astfel de distribuții sistemice. Vezi, de exemplu, Current Topics in Medicinal Chemistry 13, 777-80 (2013), citată mai sus, pentru o descriere a țesutului intestinal, transportului de-a lungul acestuia, și metabolismului.

Un motiv major pentru uzura candidaților medicamentoși este siguranța și tolerabilitatea. Vezi, de exemplu, I. Kola, și colab., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 711-5 (2004); M.J. Waring, și colab., An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 475-86 (2015); M. Hay, și colab., Clinical development success rates for investigational drugs, *Nature Biotechnology* 32, 40-51 (2014); și M.E. Bunnage, Getting pharmaceutical R&D back on target, *Nature Chemical Biology* 7, 335-9 (2011). Creșterea concentrațiilor de țesut local ale compusului la țesutul țintă intenționat, în timp ce se limitează expunerea la alt țesut, poate reduce efectele secundare nedorite. Vezi, de exemplu, V.P. Torchilin, Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl 2, S81-91 (2000). Acest concept a fost acceptat la scară pentru anumite boli și țesuturi, cum ar fi ochii (vezi, de exemplu, R. Gaudana, și colab., Ocular drug delivery, *The AAPS Journal* 12, 348-60 (2010)), pielea (vezi, de exemplu, R. Folster-Holst, și colab., Topical hydrocortisone 17-butyrate 21-propionate in the treatment of inflammatory skin diseases: pharmacological data, clinical efficacy, safety and calculation of therapeutic index, *Die Farmazie* 71, 115-21 (2016)), și plămâni (vezi, de exemplu, J.S. Patil, și colab., Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review, *Lung India: official organ of Indian Chest Society* 29, 44-9 (2012)). Similar cu aceste abordări de țintire a țesutului, creșterea concentrațiilor de medicamente intestinale în timp ce se limitează nivelurile nedorite de medicament în alte țesuturi, poate crește marginile de siguranță. Vezi, de exemplu, I.R. Wilding, și colab., Targeting of drugs and vaccines to the gut, *Pharmacology & Therapeutics* 62, 97-124 (1994); D. Charmot, Non-systemic drugs: a critical review, *Current Pharmaceutical Design* 18, 1434-45 (2012); și Current Topics in Medicinal Chemistry 13, la 780 (2013), citate mai sus. Modularea selectivă a țesutului țintei în țesutul gastrointestinal cu compuși care obțin expuneri sistemice limitate, poate îmbunătăți potențialul indicele terapeutic al unor astfel de compuși pentru tratamentul bolilor tractului gastrointestinal incluzând colita ulcerativă și boala Crohn. Vezi, de exemplu, O. Wolk, și colab., New targeting strategies in drug therapy of inflammatory bowel disease: mechanistic approaches and opportunities, *Expert Opin. Drug Deliv.* 10(9), 1275-86 (2013). Termenul „efecte sistemice” este utilizat aici pentru a se referi la expunerea sistemică și efectele oricărei astfel de expuneri sistemice, chiar dacă acestea nu sunt întotdeauna aceleași.

Deoarece unii inhibitori cunoscuți ai JAK au efecte adverse care sunt asociate cu efectele lor sistemice, este de dorit să se găsească noi inhibitori ai JAK ca substanțe active pentru prevenirea și/sau controlul răspunsului inflamator excesiv și ale căror efecte sistemice să fie eliminate sau reduse. Este și mai mult de dorit să se găsească inhibitori ai JAK cu efect local asupra țesuturilor gastrointestinale pentru tratamentul afecțiunilor cum ar fi, dar fără a se limita la, IBD, cu efecte sistemice reduse. Datorită rolului jucat de diferitele proteine JAK, este și mai mult de dorit să se găsească inhibitori pan-JAK.

Țintirea țesutului intestinal poate fi urmărită în principiu în conformitate cu multiple strategii. Vezi, de exemplu, Current Topics in Medicinal Chemistry 13, la 780-95 (2013), citată mai sus, care se referă la abordări care includ abordări de proprietăți fizico-chimice, abordări mediate de transport, abordări de promedicament, și abordări de formulare și tehnologie. Se recunoaște totuși că, există un „număr de provocări și capcane care sunt endemice pentru programele de țintirea țesutului” și în

particular pentru compușii țintiți intestinal, cum s-a descris în Current Topics in Medicinal Chemistry 13, la 795 (2013), citată mai sus.

Afecțiunile IBD se pot extinde în multiple părți ale tractului gastrointestinal. Chiar dacă numai în scopuri ilustrative simplificate, un situs al bolii colonice (10) este prezentat în colonul descendent în Fig. 1, boala inflamatorie intestinală poate afecta orice parte din tractul gastrointestinal cum este cazul bolii Crohn, sau în rect și colon, ca la colita ulcerativă. Vezi, de exemplu, NIDDK (National Institute of Diabetes, and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, <<http://spotidoc.com/doc/71780/crohns-disease---national-digestive-diseases-information>>, accesat pe 29 nov., 2016. Siturile bolii IBD pot fi, de exemplu, ileumale (situate pe ileum), ileumocolice (afectând porțiuni de ileum și colon), și colonice (situate în colon, cum s-a prezentat ilustrativ în colonul descendent în Fig. 1). Astfel, în anumite scenarii de boală, se poate dori o livrare de medicament de-a lungul întregului sau unei porțiuni largi a tractului intestinal. În alte scenarii de boală, se poate dori să se crească concentrația locală la orice porțiune dată a tractului gastrointestinal. În încă alte scenarii, s-ar putea dori o combinație a acestor două forme de livrare la diferite situsuri în tractul intestinal.

Unul din astfel de scenarii s-ar concentra pe livrarea unei substanțe active care are efecte sistemice limitate din cauza absorbției limitate când trece prin tractul gastrointestinal cum s-a exemplificat prin săgețile cu linie continuă în Fig. 1, în timp ce este disponibilă să acționeze în porțiuni extensive ale tractului gastrointestinal (GI), o caracteristică la care se face referire în acest document ca „efecte GI locale”. Datorită efectelor sistemice reduse, un interval mai larg de dozaje ar putea fi evaluat pentru o astfel de substanță. Ar fi în plus de dorit, dacă o astfel de substanță activă a avut permeabilitate redusă, ca numai o cantitate mică să treacă prin peretele intestinal în fluxul sanguin pentru a limita efectele adverse secundare nedorite când atinge zonele nețintite.

În plus, inhibitorii JAK sunt avuți în vedere ca candidați pentru tratamentul pentru alte boli. Ei sunt avuți în vedere pentru utilizare în tratamentul afecțiunilor oculare incluzând ochiul uscat (B. Colligris, și colab., Recent developments on dry eye disease treatment compounds, Saudi J. Ophthalmol. 28(1), 19-30 (2014)), neoplasme mieloproliferative, boli mieloproliferative (E.J. Baxter, și colab., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, Lancet 365, 1054-1061 (2005); C. James, și colab., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera, Nature 434, 1144-1148 (2005); R. Kralovics, și colab., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders, N. Engl. J. Med. 352, 1779-1790 (2005); R.L. Levine, și colab., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis, Cancer Cell, 387-397 (2005); G. Wernig, și colab., Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, Cancer Cell 13, 311-320 (2008)), sindrom mieloproliferativ, leucemie mieloidă acută, sindrom al răspunsului inflamator sistemic, debut sistemic al artritei juvenile reumatoide, artrită idiopatică juvenilă (H.W. Li, și colab., Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis, Exp. Ther. Med. 11(6), 2531-2536 (2016)), reacții de hipersensibilitate de tip III, hipersensibilitate de tip IV, inflamație a aortei, neurită iridociclită/uveită/optică, atrofie musculară spinală juvenilă, retinopatie diabetică, boală renală diabetică incluzând nefropatie diabetică (F.C. Brosius, și colab., JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease, Diabetologia 59(8), 1624-7, (2016); C.C. Berthier, și colab., Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy, Diabetes 58(2), 469-77, (2009); E.N. Gurzov, și colab., The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes, FEBS J. 283(16), 3002-15 (2016)), microangiopatie, inflamație (M. Kopf, și colab., Averting inflammation by targeting the cytokine environment, Nature Reviews Drug Discovery 9, 703-718 (2010); J.J. O'Shea, și colab., A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway, Nature Rev. Drug Discov. 3, 555-564 (2004)), inflamație cronică, boală inflamatorie intestinală incluzând colită ulcerativă (UC) și boală Crohn (R.H. Duerr, și colab., A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene, Science 314, 1461-1463 (2006); M. Coskun, și colab., Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, Pharmacol. Res. 76, 1-8 (2013); M.J. Waldner, și colab., Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development, Semin. Immunol. 26(1), 75-9 (2014); S. Danese, și colab., JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 310(3), G155-62 (2016); W. Strober, și colab., Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, Gastroenterology 140, 1756-1767 (2011)), boli alergice, vitiligo, dermatită atopică (R. Bissonnette, și colab., Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial, Br. J. Dermatol. 175(5), 902-911 (2016); W. Amano, și colab., JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by downmodulating T cell activation and differentiation, J. Dermatol. Sci. 84, 258-265 (2016); T. Fukuyama, și colab., Topically Administered Janus-Kinase Inhibitors Tofacitinib and Oclacitinib Display Impressive

- Antipruritic and Anti-Inflammatory Responses in a Model of Allergic Dermatitis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354(3), 394-405 (2015)), alopecia areata (A.K. Alves de Medeiros, și colab., JAK3 as an Emerging Target for Topical Treatment of Inflammatory Skin Diseases, *PLoS One* 11(10) (2016); L. Xing, și colab., Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition, *Nat. Med.* 20(9), 1043-9 (2014)), sclerodermie dermatitică, boală imună acută sau cronică asociată cu transplantul de organ (P.S. Modificarelian, și colab. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor, *Science* 302, 875-878 (2003); F. Behbod, și colab. Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts, *J. Immunol.* 166, 3724-3732 (2001); S. Busque, și colab. Calcineurin-inhibitor-free immunosuppression based on the JAK inhibitor CP-690,550: a pilot study in de novo kidney allograft recipients, *Am. J. Transplant.* 9, 1936-1945 (2009)), artropatie psoriatică, artropatie colitică ulcerativă, boală buloasă autoimună, anemie hemolitică autoimună, artrită reumatoidă (J.M. Kremer, și colab., A randomized, double-blind placebo-controlled trial of 3 dose levels of CP-690,550 versus placebo in the treatment of active rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 54 (annual meeting abstract), L40 (2006); W. Williams, și colab. A randomized placebo-controlled study of INCB018424, a selective Janus kinase1&2 (JAK1&2) inhibitor in rheumatoid arthritis (RA), *Arthritis Rheum.* 58, S431 (2008); N. Nishimoto, și colab., Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab, *Ann. Rheum. Dis.* 66(9), 1162-7 (2007)), artrită reumatoidă asociată cu boala pulmonară interstițială, lupus eritematos sistemic (A. Goropevšek, și colab., The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* (on-line pre-publication) <<http://www.docguide.com/role-stat-signaling-pathways-pathogenesis-systemic-lupus-erythematosus?tsid=5>> May 23, 2016; M. Kawasaki, și colab., Possible role of the JAK/STAT pathways in the regulation of T cell-interferon related genes in systemic lupus erythematosus, *Lupus.* 20(12), 1231-9 (2011); Y. Furumoto, și colab., Tofacitinib ameliorates murine lupus and its associated vascular dysfunction, *Arthritis Rheumatol.*, (on-line pre-publication) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429362>> 18 iulie, 2016)), lupus eritematos sistemic asociat cu boala pulmonară, dermatomiozită/polimiozită asociate cu boală pulmonară, astm (K. Vale, Targeting the JAK/STAT pathway in the treatment of 'Th2-high' severe asthma, *Future Med. Chem.* 8(4), 405-19 (2016)), spondilită anchilozantă (AS) (C. Thompson, și colab., Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis, *Cytokine* 86, 92-9 (2016)), boală pulmonară asociată cu AS, hepatită autoimună, hepatită autoimună de tip-1 (hepatită autoimună clasică sau lupoidă), hepatită autoimună de tip-2 (hepatita anticorpului anti-LKM), hipoglicemie mediata autoimun, psoriazis (C.L. Leonardi, și colab., Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1), *Lancet* 371, 1665-1674 (2008); G. Chan, și colab., Dose-dependent reduction in psoriasis severity as evidence of immunosuppressive activity of an oral Jak3 inhibitor in humans, *Am. J. Transplant* 6, S87 (2006); K.A. Papp, și colab., Efficacy and safety of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in the treatment of psoriasis: a phase 2b randomized placebo-controlled dose-ranging study, *Br. J. Dermatol.* 167, 668-677 (2012); M. Cargill, și colab. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes, *Am. J. Hum. Genet.* 80, 273-290 (2007)), psoriazis de tip 1, psoriazis de tip 2, psoriazis cu plăci, psoriazis cu plăci cronic moderat până la sever, neutropenie autoimună, autoimunitate spermatică, scleroză multiplă (toate subtipurile, B.M. Segal, și colab., Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study, *Lancet Neurol.* 7, 796-804 (2008); Z. Yan, și colab., Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases, *Clin. Immunol.* (online pre-publication) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713030>>, accesat pe 3 octombrie, 2016; E.N. Benveniste, și colab., Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Interferon Cytokine Res.* 34(8), 577-88 (2014).; Y. Liu, și colab., Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 192(1), 59-72 (2014)), febră reumatică acută, sindrom Sjogren, sindrom Sjogren/boală asociată cu boala pulmonară (T. Fujimura, și colab., Significance of Interleukin-6/STAT Pathway for the Gene Expression of REG 1α, a New Autoantigen in Sjögren's Syndrome Patients, in Salivary Duct Epithelial Cells, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* (online pre-publication) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339601>> 24 iunie, 2016), trombocitopenie autoimună, neuroinflamație incluzând boala Parkinson (Z. Yan, și colab., 3 oct., 2016, citată mai sus). Inhibitorii JAK au fost raportați ca având aplicații terapeutice în tratamentul cancerului în plus față de bolile inflamatorii. (S.J. Thomas, și colab., The role of JAK/STAT signaling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumors, *British J. Cancer* 113, 365-71 (2015); A. Kontzias, și colab., Jakinibs: A new class of kinase

inhibitors in cancer and autoimmune disease, *Current Opinion in Pharmacology*, 12(4), 464-70 (Aug. 2012); M. Pesu, și colab., *Therapeutic targeting of JANUS kinases*, *Immunological Reviews*, 223, 132-42 (iun. 2008); P. Norman, *Selective JAK inhibitors in development for rheumatoid arthritis*, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(8), 1067-77 (aug. 2014)). În plus, inhibitorii JAK ar putea fi utili în prevenirea cancerului colorectal deoarece reducând inflamația în colon ar putea conduce la prevenirea cancerului într-un astfel de organ.

WO 2011/086053 A1 descrie compuși care „pot fi furnizați în compoziții acceptabile farmaceutic și utilizați pentru tratamentul tulburărilor imunologice sau hiperproliferative”.

WO 2013/007765 A1 descrie compuși care „pot fi furnizați în compoziții acceptabile farmaceutic și utilizați pentru tratamentul tulburărilor imunologice sau hiperproliferative”.

Mark Zak și colab. descriu „descoperirea bazată pe structura unui radical C-2 hidroxietil care a furnizat niveluri ridicate consistente de selectivitate pentru JAK1 față de JAK2 la seriile de imidazopirolopiridină ale inhibitorilor JAK1” în 'Identificarea C -2 Hidroxietil Imidazopirolo-piridinelor ca inhibitori potenți ai JAK1 cu proprietăți fizico-chimice favorabile și selectivitate ridicată față de JAK2', *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 56, nr. 11, 31 mai 2013, paginile 4764-4785.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Această invenție se referă la următorii compuși:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil) acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă;
 N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-((tetrahydro-2*H*-piran-4-il)metil)acetamidă;
 N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetamidă;
 N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic ale unor astfel de compuși, și combinații ale acestora.

Termenul „compuși invenției” și „compus al invenției” sunt intenționați să cuprindă cel puțin un compus selectat din grupul compușilor de mai sus, indiferent dacă într-o formă fără solvent sau în oricare dintre formele hidratate și/sau solvate cum s-a ilustrat aici.

Realizările din prezenta invenție se referă la compuși, și compozițiile farmaceutice care îi conțin. Sunt divulgate în acest document metode de realizare și purificare a acestora, metode de utilizare a acestora ca inhibitori ai JAK și metode pentru utilizarea acestora în tratamentul stărilor de boală, tulburări, și afecțiuni mediate de JAK.

Realizările acestei invenții prezintă efecte de inhibare pan-JAK cu efecte GI locale și efecte sistemice reduse sau neglijabile. Mai mult, realizările acestei invenții cu astfel de caracteristici pot fi administrate oral.

Este divulgată aici o metodă de tratare a unui subiect care suferă de, sau este diagnosticat cu o boală, tulburare, sau afecțiune medicală mediate de JAK utilizând compușii invenției sau agenții activi ai invenției.

Realizările suplimentare, caracteristicile, și avantajele invenției vor fi evidente din următoarea descriere detaliată și prin practica invenției.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1.

Diagramă schematică a unei părți din tractul gastrointestinal uman, prezentată ca o redare întinsă nu la scară. Duodenul (3), jejunul (4), și ileumul (5) (toate prezentate schematic) formează intestinul subțire

după stomac (2) și esofag (1). Intestinul gros cuprinde colonul (6), incluzând în schimb cecumul (7) și apendicele (nu este prezentat), colonul ascendent, colonul transversal, colonul descendent, colonul sigmoid (bucla acestuia nu este prezentată), și rectul (11). Colonul transversal este porțiunea cuprinsă între flexurile colonice dreaptă (8) și stângă (9), colonul ascendent se extinde de la cecum (7) la flexura colonică dreaptă (8), și colonul descendent se extinde de la flexura colonică stângă (9) la rectul (11). Diferitele tipare de distribuție sunt ilustrate cu referire la colon pentru conveniență, dar ele se pot referi de asemenea la alte părți ale tractului gastrointestinal. Distribuția sistemică este reprezentată cu săgeți cu linie întreruptă în Fig. 1 cum străpung prin pereții colonului în scopuri ilustrative simplificate, dar o astfel de distribuție nu se limitează la pereții colonului, pentru că poate avea loc de asemenea prin pereții altor părți ale tractului gastrointestinal prezentat în Fig. 1, cum ar fi cele ale intestinului subțire. Distribuția cu unele penetrări în țesut este reprezentată prin săgeți cu linie continuă în Fig. 1 ca penetrare a țesutului colonului în scopuri ilustrative simplificate, dar o astfel de penetrare nu este limitată la țesutul colonului, pentru că poate avea de asemenea loc în țesutul altor părți ale tractului gastrointestinal prezentat în Fig. 1, cum ar fi țesutul intestinului subțire. Efectul unei realizări a unui inhibitor al JAK în conformitate cu această invenție este prezentat ilustrativ ca perturbând calea de semnalizare JAK/STAT care altfel ar conduce la inflamația asociată cu o boală inflamatorie intestinală („IBD”), cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerativă. Cu titlu de exemplu, dar nu ca limitare, un situs al bolii este prezentat ilustrativ ca situs al bolii colonice (10) în colonul descendent.

Figura 2.

Diagramă schematică prezentând prepararea/interconversia realizărilor compusului din Ex. 1.

Figura 3.

Suprapunerea tiparelor de difracție cu raze X pe pulbere cu randament ridicat (HT-XRPD) pentru următoarele realizări ale compusului din Ex. 1, de jos în sus: Is, 2 (obținut prin echilibrare la temperatura camerei în 1,4-dioxan), 3b (obținut prin termociclare în ciclohexanonă), 1b+4 (obținut prin răcirea cristalizării la scară μL în metanol/apă (50/50, v/v), 5 (obținut prin termociclare în cloroform), 6 (obținut prin răcirea cristalizării la scară mL în acetonitril), 7 (obținut din 1s+7, obținut în schimb prin echilibrarea solventului în heptan), 7 (obținut prin desolvarea lui 1s+7, obținut în schimb prin echilibrarea solventului în heptan), 8 (obținut prin desolvarea din realizarea 5 prin calorimetrie cu scanare diferențială ciclică)), și 9 (obținut prin desolvarea din realizarea 2 prin calorimetrie cu scanare diferențială ciclică).

Figura 4.

Suprapunerea tiparelor de difracție cu raze X pe pulbere cu randament ridicat (HT-XRPD) pentru următoarele realizări ale compusului din Ex. 1, de jos în sus: Is (materie primă), 1a (obținut după expunere la condiții de îmbătrânire accelerată (AAC) (40°C și 70% umiditate relativă) câteva forme de mostre din realizarea Is), 1b (obținut prin echilibrarea solventului la temperatura camerei în toluen), 1c (obținut prin răcirea cristalizării la scară μL în acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v)), 1d (obținut prin răcirea cristalizării la scară μL în acetonitril/cloroform (50/50, v/v)), 1e (obținut prin răcirea cristalizării la scară μL în acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v)), 1f (obținut prin echilibrarea solventului la temperatura camerei în p-xilen), 1g (obținut prin echilibrarea solventului la 50°C în anisol), 1h (obținut prin răcirea cristalizării la scară μL în p-xilen).

Figura 5.

Suprapunerea tiparelor de difracție cu raze X pe pulbere cu randament ridicat (HT-XRPD) pentru următoarele realizări ale compusului din Ex. 1, de jos în sus: Is, 3b (obținut prin termociclare în ciclohexanonă), 3c (obținut prin răcirea cristalizării la scară la μL în 1,4-dioxan), 3d (obținut prin răcirea cristalizării la verificarea μL în tetrahidrofuran), și 3e (obținut prin termociclare în izobutanol).

Figura 6.

Difractogramele HR-XRPD din realizarea Is în forma sa inițială („Is”), după o expunere de patru zile la 40°C și 70% umiditate relativă („Is 70 RH”), și după o expunere de patru zile la 25°C și 100% umiditate relativă („10”).

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenii „incluzând”, „conținând” și „cuprinzând” sunt utilizați în sensul lor deschis, nelimitativ.

Orice formulă dată intenționează să reprezinte compuși având structuri reprezentate prin formula structurală precum și anumite variații sau forme. Anumite structuri pot exista ca tautomeri. Suplimentar, o formă amorfă, hidrați, solvați, polimorfe și pseudopolimorfe ale unor astfel de compuși ai acestei invenții, și amestecuri ale acestora, sunt de asemenea avute în vedere ca părți ale acestei invenții. Realizările acestei invenții sunt într-o formă fără solvent sau în oricare dintre formele hidratate și/sau solvate cum s-a ilustrat aici.

Referința la un compus de aici reprezintă o referință la oricare dintre: (a) formele enumerate de fapt ale unui astfel de compus, și (b) oricare din formele unui astfel de compus în mediul în care compusul este considerat când este denumit. De exemplu, referința aici la un compus cum ar fi R-COOH, cuprinde referința la oricare dintre, de exemplu, R-COOH_(s), R-COOH_(sol), și R-COO⁻_(sol). În acest

exemplu, $R-COOH_{(s)}$ se referă la compusul solid, care ar putea fi de exemplu într-o tabletă sau unele alte compoziții sau preparări farmaceutice solide; $R-COOH_{(sol)}$ se referă la forma nedisociată a compusului într-un solvent; și $R-COO^{-}_{(sol)}$ se referă la forma disociată a compusului într-un solvent, cum ar fi forma disociată a compusului într-un mediu apos, dacă o astfel de formă disociată derivă din $R-COOH$, dintr-o sare a acestuia, sau din orice altă entitate care dă $R-COO^{-}$ după disociere în mediul care este considerat. Într-un alt exemplu, o expresie cum ar fi „expunerea unei entități la compusul cu formula $R-COOH$ ” se referă la expunerea unei astfel de entități la forma, sau formele, compusului $R-COOH$ care există, sau există, în mediul în care o astfel de expunere are loc. În încă un alt exemplu, o expresie cum ar fi „punerea în reacție a unei entități cu un compus cu formula $R-COOH$ ” se referă la punerea în reacție a (a) unei astfel de entități în formă relevantă chimic, sau forme, ale unei astfel de entități care există, sau există, în mediul în care o astfel de punere în reacție are loc, cu (b) forma sau formele relevante chimic ale compusului $R-COOH$ care există, sau există, în mediul în care o astfel de punere în reacție are loc. În această privință, dacă o astfel de entitate este de exemplu într-un mediu apos, se înțelege că compusul $R-COOH$ este în același mediu, și prin urmare entitatea este expusă la specii cum ar fi $R-COOH_{(aq)}$ și/sau $R-COO^{-}_{(aq)}$, unde indicele „(aq)” înseamnă „apos” în conformitate cu sensul său convențional din chimie și biochimie. O grupare funcțională de acid carboxilic a fost aleasă în aceste exemple de nomenclatură; aceasta alegere nu este intenționată totuși ca limitare, ci este numai o ilustrare. Se înțelege că exemple analoage pot fi furnizate în termenii altor grupări funcționale, incluzând dar fără a se limita la hidroxil, membri bazici de azot, cum ar fi cei din amine, și orice altă grupare care interacționează sau se transformă în conformitate cu manierele cunoscute în mediul care conține compusul. Astfel de interacțiuni și transformări includ, dar nu sunt limitate la, disociere, asociere, tautomerism, solvolize, incluzând hidroliză, solvare, incluzând hidratare, protonare, și deprotonare. Nici un alt exemplu în această privință nu este furnizat aici deoarece aceste interacțiuni și transformări într-un mediu dat sunt cunoscute de către orice persoană având calificare obișnuită în domeniu.

Orice formulă dată aici intenționează de asemenea să reprezintă forme nemarcate precum și forme marcate izotopic ale compușilor. Compușii marcați izotopic au structuri reprezentate prin formulele date aici cu excepția faptului că unul sau mai mulți atomi sunt înlocuiți cu atomi având o masă atomică sau număr de masă selectate într-o formă îmbogățită. Exemple de izotopi care pot fi încorporați în compușii invenției într-o formă care depășește abundența naturală includ izotopi de hidrogen, carbon, azot, și oxigen cum ar fi 2H , 3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , și respectiv ^{17}O . Astfel de compuși marcați izotopic sunt utili în studii metabolice (preferabil cu ^{14}C), studii de cinetici ale reacției (cu, de exemplu deuteriu (adică, D sau 2H); sau tritii (adică, T sau 3H)), tehnici de detecție sau imagistice [cum ar fi tomografie cu emisie de pozitron (PET) sau tomografie computerizată cu emisia unui singur foton (SPECT)] incluzând teste de distribuție ale medicamentului sau țesutului substratului, sau în tratamentul radioactiv al pacienților. În particular, un compus marcat cu ^{18}F sau ^{11}C poate fi în special preferat pentru studii PET sau SPECT. Mai mult, substituția cu izotopi mai grei cum ar fi deuteriu (adică, 2H) poate oferi anumite avantaje terapeutice care rezultă din mai marea stabilitate metabolică, de exemplu perioada de înjumătățire *in vivo* locală crescută sau cerințe de dozaj reduse. Compușii marcați izotopic ai acestei invenții pot fi preparați în general prin efectuarea procedurilor divulgate în scheme sau în exemplele și preparările descrise mai jos prin substituirea cu ușurință a unui reactiv marcat izotopic disponibil cu un reactiv marcat neizotopic.

„Tautomerii” se referă la compuși care sunt forme interschimbabile ale unei structuri particulare de compus, și care variază în deplasarea atomilor de hidrogen și electronilor. Astfel, două structuri care au un membru H în diferite poziții pot fi în echilibru în timp ce îndeplinesc regulile de valență. De exemplu, enolii și cetonele sunt tautomeri deoarece sunt rapid interconvertite prin tratamentul fie cu acid sau fie cu bază.

Când se face referire la orice formulă dată aici, selecția unui radical particular dintr-o listă de specii posibile pentru o variabilă specificată nu intenționează să definească aceeași alegere a speciilor pentru variabila care apare în altă parte. Cu alte cuvinte, unde o variabilă apare mai mult de o dată, alegerea speciilor dintr-o listă specificată este independentă de alegerea speciilor pentru aceeași variabilă în altă parte în formulă, în afară de cazul când s-a afirmat altfel.

Cu titlul unui prim exemplu de terminologie substituentă, dacă exemplul S^1 de substituent este unul dintre S_1 și S_2 , și exemplul S^2 de substituent este unul dintre S_3 și S_4 , atunci aceste atribuiri se referă la realizări ale acestei invenții date în conformitate cu alegerea că exemplul S^1 este S_1 și exemplul S^2 este S_3 ; exemplul S^1 este S_1 și exemplul S^2 este S_4 ; exemplul S^1 este S_2 și exemplul S^2 este S_3 ; exemplul S^1 este S_2 și exemplul S^2 este S_4 ; și echivalenții fiecăreia dintr-o astfel de alegere. Terminologia mai scurtă „exemplul S^1 este unul dintre S_1 și S_2 , și exemplul S^2 este unul dintre S_3 și S_4 ” este utilizată corespunzător aici pentru concizie, dar nu ca limitare. Primul exemplu anterior de terminologie substituentă, care este declarat în termeni generici, se înțelege că ilustrează diferitele atribuiri substituente descrise aici.

Mai mult, când mai mult de o atribuire este dată pentru orice membru sau substituent, realizările acestei invenții cuprind diferite grupări care pot fi făcute din atribuirile listate, luate în mod independent,

și echivalenții acestora. Cu titlul unui al doilea exemplu de terminologie substituentă, dacă este descris aici că substituentul S_{exemplu} este unul dintre S_1 , S_2 , și S_3 , această listă se referă la realizările acestei invenții pentru care S_{exemplu} este S_1 ; S_{exemplu} este S_2 ; S_{exemplu} este S_3 ; S_{exemplu} este unul dintre S_1 și S_2 ; S_{exemplu} este unul dintre S_1 și S_3 ; S_{exemplu} este unul dintre S_2 și S_3 ; S_{exemplu} este unul dintre S_1 , S_2 și S_3 ; și S_{exemplu} este orice echivalent al fiecăreia dintre aceste alegeri. Terminologia mai scurtă „ S_{exemplu} este unul dintre S_1 , S_2 , și S_3 ” este utilizată corespunzător aici pentru concizie, dar nu ca limitare. Al doilea exemplu anterior de terminologie substituentă, care este declarat în termeni generici, se înțelege că ilustrează diferitele asignări substituenți descrise aici.

Următorii inhibitori ai JAK sunt realizări ilustrative ale invenției:

- 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianonietil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]pyridin-2-il) -N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil) acetonitril;
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă;
- N*-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3 -*b*]piridin-2-il)acetamidă;
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]pyridin-2-il) -N-(tetrahydro-2*H*-piran-4-il)acetamidă;
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N((tetrahydro-2*H*-piran-4-il)metil)acetamidă;
- N*-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;
- 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetamidă;
N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă; și
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă.

Realizări suplimentare ale invenției sunt sărurile acceptabile farmaceutic ale compușilor dați mai sus.

- Realizări suplimentare ale invenției sunt compozițiile farmaceutice care cuprind fiecare o cantitate eficientă din cel puțin un compus dat mai sus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

- O „sare acceptabilă farmaceutic” este o sare dintr-un compus care este netoxică, tolerabilă biologic, sau altfel adecvată biologic pentru administrare către subiect. Vezi, în general, S.M. Berge, și colab., „Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977), și Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection, and Use, Stahl și Wermuth, Eds., Wiley-VCH și VHCA, Zurich, 2002. Compușii invenției pot poseda o grupare acidică suficientă, o grupare bazică suficientă, sau ambele tipuri de grupări funcționale, și reacționează corespunzător cu un număr de baze anorganice sau organice, și acizi anorganici și organici, pentru a forma o sare acceptabilă farmaceutic. Exemple de săruri acceptabile farmaceutic includ sulfați, pirosulfați, bisulfați, sulfiți, bisulfiți, fosfați, monohidrogen-fosfați, dihidrogenfosfați, metafosfați, pirofosfați, cloruri, bromuri, ioduri, acetați, propionați, decanoați, capriolați, acirilați, formați, izobutiraiți, caproați, heptanoați, propiolați, oxalați, malonați, succinați, suberați, sebacați, fumaraiți, maleați, butiră-1,4-dioați, hexină-1,6-dioați, benzoați, clorobenzoați, metilbenzoați, dinitrobenzoați, hidroxibenzoați, metoxibenzoați, ftalați, sulfonați, xileniulfonați, fenilacetați, fenilpropionați, fenilbutiraiți, citrați, lactați, γ -hidroxibutiraiți, glicolați, tartrați, metan-sulfonați, propansulfonați, naftalenă-1-sulfonați, naftalenă-2-sulfonați, și mandelați.

- Dacă compusul invenției conține cel puțin un azot bazic, sarea dorită acceptabilă farmaceutic poate fi preparată prin orice metodă adecvată disponibilă în domeniu, de exemplu, tratamentul bazei libere cu un acid anorganic, cum ar fi acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid sulfamic, acid azotic, acid boric, și acid fosforic, sau cu un acid organic, cum ar fi acid acetic, acid fenilacetic, acid propionic, acid stearic, acid lactic, acid ascorbic, acid maleic, acid hidroximaleic, acid isetionic, acid succinic, acid valeric, acid fumaric, acid malonic, acid piruvic, acid oxalic, acid glicolic, acid salicilic, acid oleic, acid palmitic, acid lauric, un acid piranosidil, cum ar fi acidul glucuronic sau acidul galacturonic, un acid alfa-hidroxi, cum ar fi acidul mandelic, acidul citric, sau acidul tartric, un aminoacid, cum ar fi acidul aspartic sau acidul glutamic, un acid aromatic, cum ar fi acidul benzoic, acidul 2-acetoxibenzoic, acidul naftoic, sau acidul cinamic, un acid sulfonic, cum ar fi acidul laurilsulfonic, acidul p-toluensulfonic, acidul metansulfonic, acidul etansulfonic, orice amestec compatibil

de acizi cum ar fi cele date ca exemple aici, și orice alt acid și amestecuri ale acestora care sunt privite ca substituții echivalente sau acceptabile în lumina nivelului obișnuit de competențe în această tehnologie.

Nu toate realizările de săruri acceptabile farmaceutic ale compușilor în conformitate cu această invenție pot fi la fel de adecvate pentru dezvoltarea acestora, pentru compușii care sunt suficient de slabi bazici (*de exemplu*, pKa de aproximativ 4) ar putea să nu formeze săruri suficient de stabile în scopuri de dezvoltare. *Vezi, de exemplu*, G.A. Stefenson, și colab., J. Pharm. Sciences 100(5), 1607-17 (2011) „Physical stability of salts of weak bases in the solid state”. Unele realizări ale acestei invenții sunt avute în vedere să cuprindă forme co-cristalizate dintr-un compus în conformitate cu această invenție cu un formator de co-cristal adecvat. Design-ul și proprietățile co-cristalelor pentru utilizare farmaceutică și metodele de realizare și caracterizare ale acestora au fost date în, de exemplu, N. Shan, și colab., Drug Discovery Today, 13(9/10), 440-46 (2008) „The role of cocrystals in pharmaceutical science”; N. Qiao, și colab., Intl. J. Pharmaceutics, 419, 1-11 (2011) „Pharmaceutical cocrystals: An overview”; R. Thakuria, și colab., Intl. J. Pharmaceutics, 453, 101-25 (2013) „Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs”.

Compușii invenției, incluzând sărurile lor acceptabile farmaceutic, indiferent dacă sunt singuri sau în combinație, (colectiv, „agent activ” sau „agenți activi”) sunt utili ca inhibitori ai JAK în metodele invenției. Astfel de metode pentru modularea activității JAK cuprind expunerea JAK la o cantitate eficientă din cel puțin un compus chimic al invenției.

Inhibitorul JAK poate fi utilizat la un subiect diagnosticat cu, sau care suferă de o boală, tulburare, sau afecțiune medicală mediate prin activitatea JAK, cum ar fi cele descrise aici. Simptomele sau stările de boală sunt intenționate să fie incluse în domeniul „bolilor, tulburări sau afecțiunilor medicale”.

Corespunzător, agenții activi descriși aici pot fi utilizați pentru a trata subiecții diagnosticați cu, sau care suferă de o boală, tulburare, sau afecțiune medicală mediate de JAK. Termenul „tratează” sau „tratarea” așa cum s-a utilizat în acest document este intenționat să se refere la administrarea unui agent activ sau compoziție a invenției unui subiect în scopul de a afecta un beneficiu terapeutic sau profilactic prin modularea JAK. Tratarea include inversarea, ameliorarea, atenuarea, inhibarea progresului, atenuarea severității, reducerea, sau prevenirea unei boli, tulburări, sau afecțiuni, sau a unuia sau mai multor simptome ale unei astfel de boli, tulburări sau afecțiuni mediate prin modularea activității JAK. Termenul „subiect” se referă la un pacient mamifer care are nevoie de un astfel de tratament, cum ar fi un om. Termenul „inhibitori” sau „inhibitor” se referă la compușii care scad, previn, inactivează, desensibilizează sau reglează negativ expresia sau activitatea JAK.

Realizările acestei invenții furnizează inhibitori ai JAK pentru prevenirea și/sau controlul răspunsului inflamator excesiv. Realizările inhibitorilor JAK în conformitate cu această invenție sunt inhibitori pan-JAK.

În afară de cazul când se indică altfel, termenul „proprietăți fizico-chimice ale inhibitorului JAK” se referă la proprietățile denumite corespunzător după cum urmează:
cum s-a dat în descrierea pentru compușii Ex. 1 - 12, în cazul maselor molare;
cum s-a determinat în conformitate cu definițiile respective, în cazul numărului de donatori de legături H, acceptori și legături rotative; și
cum s-a măsurat cu referire la Tabelul 1a, coloana 2, în cazul concentrațiilor plasmatice, și la Tabelul 7, coloanele 3 și 4, în cazul coeficienților de permeabilitate A-B în prezența inhibitorului P-gp și coeficienților de permeabilitate B-A.

Sunt divulgate în acest document metode de inhibare JAK, cuprinzând expunerea unui receptor JAK la un inhibitor al JAK care este caracterizat ca având următoarele proprietăți fizico-chimice ale inhibitorului JAK: o concentrație în plasmă în intervalul de la aproximativ 0,1 ng/mL până la aproximativ 60 ng/mL, cLog P în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,8, coeficienții de permeabilitate A-B în prezența unui inhibitor P-gp în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,5, coeficienți de permeabilitate B-A în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 20, tPSA în intervalul de la aproximativ 85 până la aproximativ 120.

În metodele de inhibare a JAK, concentrația în plasmă este în intervalul de la aproximativ 10 ng/mL până la aproximativ 20 ng/mL.

În metodele de inhibare a JAK, cLogP este în intervalul de la aproximativ 0,8 până la aproximativ 1,4.

În metodele de inhibare a JAK, coeficientul de permeabilitate A-B în prezența unui inhibitor P-gp este în intervalul de la aproximativ 0,6 până la aproximativ 1,5.

În metodele de inhibare a JAK, coeficientul de permeabilitate B-A este în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 5.

În metodele de inhibare a JAK, tPSA este în intervalul de la aproximativ 100 până la aproximativ 120.

Sunt divulgate în acest document metode de inhibare JAK, cuprinzând expunerea unui receptor JAK la un inhibitor al JAK care este caracterizat în plus ca având următoarele proprietăți fizico-chimice

ale inhibitorului JAK: o masă molară în intervalul de la aproximativ 300 g mol⁻¹ până la aproximativ 500 g mol⁻¹, un număr de donatori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 2 până la aproximativ 3, un număr de acceptori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 4 până la aproximativ 5, și un număr de legături rotative în intervalul de la aproximativ 3 până la aproximativ 6, în plus față de concentrațiile de plasmă, valorile cLogP, coeficienții de permeabilitate, și valorile tPSA descrise mai sus pentru metodologiile de inhibare JAK în conformitate cu această invenție.

În metodele de inhibare a JAK, masa molară este în intervalul de la aproximativ 340 g mol⁻¹ până la aproximativ 430 g mol⁻¹.

În metodele de inhibare a JAK, numărul de legături rotative este în intervalul de la aproximativ 5 până la aproximativ 6.

Realizările acestei invenții pot fi utilizate în metode pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal al unui subiect, cuprinzând administrarea la un subiect a unei cantități eficiente farmaceutic a unui inhibitor al JAK care este caracterizat ca având următoarele proprietăți fizico-chimice ale inhibitorului JAK: o concentrație în plasmă în intervalul de la aproximativ 0,1 ng/mL până la aproximativ 60 ng/mL, cLog P în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,8, coeficienții de permeabilitate A-B în prezența unui inhibitor P-gp în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,5, coeficienții de permeabilitate B-A în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 20, tPSA în intervalul de la aproximativ 85 până la aproximativ 120.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, concentrația în plasmă este în intervalul de la aproximativ 10 ng/mL până la aproximativ 20 ng/mL.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, cLogP este în intervalul de la aproximativ 0,8 până la aproximativ 1,4.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, coeficientul de permeabilitate A-B este în prezența unui inhibitor P-gp în intervalul de la aproximativ 0,6 până la aproximativ 1,5.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, coeficientul de permeabilitate B-A este în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 5.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, tPSA este în intervalul de la aproximativ 100 până la aproximativ 120.

Sunt divulgate în acest document metode pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal al unui subiect în care proprietățile fizico-chimice ale inhibitorului JAK sunt caracterizate în plus ca având următoarele proprietăți fizico-chimice ale inhibitorului JAK: o masă molară în intervalul de la aproximativ 300 g mol⁻¹ până la aproximativ 500 g mol⁻¹, un număr de donatori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 2 până la aproximativ 3, un număr de acceptori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 4 până la aproximativ 5, și un număr de legături rotative în intervalul de la aproximativ 3 până la aproximativ 6, în plus față de concentrațiile plasmatice, valorile cLogP, coeficienții de permeabilitate, și valorile tPSA descrise mai sus pentru metodologiile de tratare a inflamației în conformitate cu această invenție.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, masa molară este în intervalul de la aproximativ 350 g mol⁻¹ până la aproximativ 430 g mol⁻¹.

În metodele pentru tratarea inflamației în tractul gastrointestinal, numărul de legături rotative este în intervalul de la aproximativ 5 până la aproximativ 6.

Sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având următoarele proprietăți fizico-chimice ale JAK: o concentrație în plasmă în intervalul de la aproximativ 0,1 ng/mL până la aproximativ 60 ng/mL, o cLogP în intervalul de la 0,1 până la aproximativ 2,8, un coeficient de permeabilitate A-B în prezența unui inhibitor P-gp în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 2,5, un coeficient de permeabilitate B-A în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 20, și o tPSA în intervalul de la aproximativ 85 până la aproximativ 120.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având o concentrație în plasmă în intervalul de la aproximativ 10 ng/mL până la aproximativ 20 ng/mL.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având valori cLogP în intervalul de la aproximativ 0,8 până la aproximativ 1,4.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având coeficientul de permeabilitate A-B în prezența unui inhibitor P-gp în intervalul de la aproximativ 0,6 până la aproximativ 1,5.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având coeficientul de permeabilitate B-A în intervalul de la aproximativ 0,5 până la aproximativ 5.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având valori tPSA în intervalul de la aproximativ 100 până la aproximativ 120.

Sunt divulgați în acest document inhibitori ai JAK având următoarele proprietăți fizico-chimice ale inhibitorului JAK: o masă molară în intervalul de la aproximativ 300 g mol⁻¹ până la aproximativ 500 g mol⁻¹, un număr de donatori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 2 până la aproximativ 3, un număr de acceptori de legături de hidrogen în intervalul de la aproximativ 4 până la

aproximativ 5, și un număr de legături rotative în intervalul de la aproximativ 3 până la aproximativ 6 în plus față concentrațiile de plasmă, valorile cLogP, coeficienții de permeabilitate, și valorile tPSA descrise mai sus pentru inhibitorii JAK în conformitate cu această invenție.

5 În plus, sunt divulgați în acest document inhibitorii ai JAK având o masă molară în intervalul de la aproximativ 350 g mol⁻¹ până la aproximativ 430 g mol⁻¹.

În plus, sunt divulgați în acest document inhibitorii ai JAK având un număr de legături rotative în intervalul de la aproximativ 5 până la aproximativ 6.

10 În metodele de tratament, o cantitate eficientă din cel puțin un agent activ conform invenției poate fi administrată unui subiect care suferă de, sau este diagnosticat ca având o astfel de boală, tulburare, sau afecțiune medicală. O „cantitate eficientă” înseamnă o cantitate sau doză suficientă pentru a aduce în general aproximativ beneficiul terapeutic sau profilactic dorit la pacienții care au nevoie de un astfel de tratament pentru respectiva boală, tulburare, sau afecțiune medicală. Cantitățile eficiente sau dozele de agenții activi din prezenta invenție pot fi stabilite prin metode de rutină cum ar fi modelarea, studii de escaladare a dozei sau studii clinice, și prin luarea în considerație a factorilor de rutină, de
15 exemplu, modul sau calea de administrare sau de livrare a medicamentului, farmacocineticele agentului, severitatea și cursul bolii, tulburării, sau afecțiunii, terapia anterioară sau în desfășurare a subiectului, starea de sănătate a subiectului și răspunsul la medicamente, și raționamentul medicului curant. Pentru un om de 70-kg, un interval ilustrativ pentru o cantitate de dozare adecvată este de la aproximativ 1 până la 1000 mg/zi în unități de dozare singure sau multiple.

20 Realizările acestei invenții sunt noi inhibitorii ai JAK ca substanțe active pentru prevenirea și/sau controlul răspunsului inflamator excesiv și ale căror efecte sistemice sunt eliminate sau reduse. Alte realizări ale acestei invenții sunt inhibitorii ai JAK cu efecte locale asupra țesuturilor gastrointestinale pentru tratamentul afecțiunilor cum ar fi, dar fără a se limita la, IBD, fără să cauzeze efecte sistemice sau cu astfel de efecte sistemice reduse acceptabil.

25 Realizările acestei invenții sunt inhibitorii cu permeabilitate redusă ai JAK. Alte realizări ale acestei invenții sunt inhibitorii ai JAK care au solubilitate apoasă.

Odată ce a avut loc îmbunătățirea bolii, tulburării, sau afecțiunii pacientului, doza poate fi ajustată pentru tratamentul preventiv sau de întreținere. De exemplu, dozajul sau frecvența administrării, sau ambele, pot fi reduse în funcție de simptome, la un nivel la care efectul terapeutic sau profilactic dorit este menținut. Desigur, dacă simptomele au fost ameliorate la un nivel adecvat, tratamentul poate înceta. Pacienții pot totuși, necesita tratament intermitent pe baza unui termen lung după orice recurență a
30 simptomelor.

În plus, compușii invenției sunt avuți în vedere pentru utilizare singuri, în combinație cu unul sau mai mulți dintre alți compuși ai acestei invenții, sau în combinație cu ingrediente active suplimentare în
35 tratamentul afecțiunilor discutate mai jos. Ingredientul activ suplimentar poate fi coadministrat separat cu cel puțin un compus al invenției, cu agenții activi ai invenției sau inclus cu un astfel de agent într-o compoziție farmaceutică conform invenției. Într-o realizare ilustrativă, ingredientul activ suplimentar este cel care este cunoscut sau descoperit ca fiind eficient în tratamentul afecțiunilor, tulburărilor, sau bolilor mediate de activitatea JAK, cum ar fi un alt inhibitor al JAK sau un compus activ împotriva unei alte ținte asociate cu afecțiunea particulară, tulburarea, sau boala. Combinația poate servi pentru a crește
40 eficacitatea (de exemplu, prin includerea în combinație a unui compus potențiator de putere sau eficacitate a unui agent conform invenției), pentru a scăde unul sau mai multe efecte secundare, sau pentru a scăde doza necesară de agent activ conform invenției.

Când se face referire la inhibarea țintei, o „cantitate eficientă” înseamnă o cantitate suficientă
45 pentru a afecta activitatea a cel puțin uneia dintre familia de proteine JAK. Măsurarea activității țintei poate fi efectuată prin metode analitice de rutină.

50 Agenții activi ai invenției sunt avuți în vedere pentru utilizare, singuri sau în combinație cu unul sau mai multe ingrediente active suplimentare, pentru a formula compozițiile farmaceutice ale invenției. O compoziție farmaceutică a invenției cuprinde o cantitate eficientă din cel puțin un agent activ conform invenției.

Excipienții acceptabili farmaceutic utilizați în mod obișnuit în compozițiile farmaceutice sunt substanțe care sunt netoxice, tolerabile biologic, și altfel adecvate biologic pentru administrare la un subiect, cum ar fi o substanță inertă, adăugată la o compoziție farmacologică sau altfel utilizată ca
55 vehicul, purtător, sau diluant pentru a facilita administrarea unui agent și care este compatibilă cu acesta. Exemple de astfel de excipienți includ carbonat de calciu, fosfat de calciu, diferite zaharuri și tipuri de amidon, derivați de celuloză, gelatină, uleiuri vegetale, și polietilen glicoli.

Livrarea formelor compozițiilor farmaceutice conținând una sau mai multe unități de dozare ale agenților activi poate fi preparată utilizând excipienți acceptabili farmaceutic și tehnici de compunere cunoscute sau care devin disponibile celor având calificare obișnuită în domeniu. Compozițiile pot fi
60 administrate în metodele invenției pe o cale adecvată de livrare, *de exemplu*, pe cale orală, parenterală, rectală, topică, sau oculară, sau prin inhalare.

Prepararea poate fi în formă de tablete, capsule, pliculețe, drajeuri, pulberi, granule, pastile, pulberi pentru reconstituire, preparări lichide, sau supozitoare. Compozițiile pot fi formulate pentru oricare dintre o multitudine de căi de administrare, cum ar fi perfuzie intravenoasă, injecție subcutanată, administrare topică, sau administrare orală. Preferabil, compozițiile pot fi formulate pentru administrare orală.

Pentru administrare orală, agenții activi ai invenției pot fi furnizați în formă de tablete, capsule, sau perle, sau ca soluție, emulsie, sau suspensie. Pentru a prepara compozițiile orale, agenții activi pot fi formulați pentru a da un dozaj de, *de exemplu*, pentru un om de 70-kg, de la aproximativ 1 până la 1000 mg/zi în unități de dozare singure sau multiple ca un interval ilustrativ.

Tabletele orale pot include ingredientul activ (ingredientele active) amestecat cu excipienți compatibili acceptabili farmaceutic cum ar fi diluanți, agenți de dezintegrare, agenți de legare, agenți de lubrifiere, agenți de îndulcire, agenți de aromatizare, agenți de colorare și agenți de conservare. Umpluturile inerte adecvate includ carbonat de sodiu și de calciu, fosfat de sodiu și de calciu, lactoză, amidon, zahăr, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol, și altele asemenea. Exemple de excipienți lichizi orali includ etanol, glicerol, apă, și altele asemenea. Amidonul, polivinil-pirolidona (PVP), amidonul glicolat de sodiu, celuloza microcristalină, și acidul alginic sunt exemple agenți de dezintegrare. Agenții de legare pot include amidon și gelatină. Agentul de lubrifiere, dacă este prezent, poate fi stearat de magneziu, acid stearic sau talc. Dacă se dorește, tabletele pot fi acoperite cu un material cum ar fi monostearatul de gliceril sau distearatul de gliceril pentru a întârzia absorbția în tractul gastrointestinal, sau pot fi acoperite cu o acoperire enterică. Acoperirile suplimentare care pot fi utilizate includ acoperiri care sunt concepute să elibereze compusul sau agent activ în funcție de timp, pH sau conținutul bacterian.

Capsulele pentru administrare orală includ capsule din gelatină tare și moale sau din (hidroxipropil)metil celuloză. Pentru a prepara capsule de gelatină tari, ingredientul activ poate fi amestecat cu un diluant solid, semi-solid, sau lichid. Capsulele din gelatină moale pot fi preparate prin amestecarea ingredientului activ cu un ulei cum ar fi ulei de arahide sau ulei de măsline, parafină lichidă, un amestec de mono și digliceride de acizi grași cu catenă scurtă, polietilen glicol 400, sau propilen glicol. Lichidele pentru administrare orală pot fi în formă de suspensii, soluții, emulsii sau siropuri sau pot fi liofilizate sau prezentate ca produs uscat pentru reconstituire cu apă sau alt vehicul adecvat înainte de utilizare. Astfel de compoziții lichide pot conține opțional: excipienți acceptabili farmaceutic cum ar fi agenți de punere în suspensie (de exemplu, sorbitol, metil celuloză, alginat de sodiu, gelatină, hidroxietilceluloză, carboximetilceluloză, stearat de aluminiu gel și altele asemenea); vehicule neapoase, de exemplu, ulei (de exemplu, ulei de migdale sau ulei fracționat din nucleu de cocos), propilen glicol, alcool etilic, sau apă; conservanți (de exemplu, metil sau propil p-hidroxibenzoat sau acid sorbic); agenți de umectare cum ar fi lecitină; și, dacă se dorește, agenți de aromatizare sau de colorare.

Agentii activi ai acestei invenții pot fi de asemenea administrați pe căi neorale. De exemplu, compozițiile pot fi formulate pentru administrare rectală ca supozitoare, clismă sau spumă. Pentru utilizare parenterală, incluzând căile intravenoasă, intramusculară, intraperitoneală, sau subcutanată, agenții invenției pot fi furnizați în soluții apoase sterile sau suspensii, tamponate la un pH și izotonicitate adecvate sau în ulei acceptabil parenteral. Vehiculele apoase adecvate includ soluția Ringer și clorura izotonică de sodiu. Astfel de forme pot fi prezentate în forme de dozare unitare cum ar fi fiolele sau dispozitivele de injecție de unică folosință, în forme multi-doză cum ar fi fiole din care poate fi extrasă doza adecvată, sau într-o formă solidă sau pre-concentrată care poate fi utilizată pentru a prepara o formulare injectabilă. Dozele de perfuzie ilustrative variază de la aproximativ 1 până la 1000 $\mu\text{g/kg/minut}$ de agent amestecat cu un purtător farmaceutic pe o perioadă care variază de la câteva minute la câteva zile.

Pentru administrare topică, agenții pot fi amestecați cu un purtător farmaceutic la o concentrație de la aproximativ 0,01% până la aproximativ 20% de medicament la vehicul, preferabil de la 0,1% până la 10%. Un alt mod de administrare al agenților invenției poate utiliza o formulare plasture pentru a efectua livrarea transdermală.

Agentii activi pot fi administrați alternativ în metodele acestei invenții prin inhalare, pe căi nazale sau orale, de exemplu, într-o formulare de pulverizare care conține de asemenea un purtător adecvat.

Realizările invenției pot fi utilizate într-o metodă de tratare a unui subiect care suferă de, sau este diagnosticat cu o boală, tulburare, sau afecțiune medicală mediate de JAK, cuprinzând administrarea către subiectul care are nevoie de un astfel de tratament a unei cantități eficiente de agent activ.

În anumite metode, boala, tulburarea, sau afecțiunea medicală este o boală inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn și colita ulcerativă.

Realizările acestei invenții pot fi utilizate într-o metodă pentru modularea activității JAK, inclusiv când o astfel de kinază este la un subiect, cuprinzând expunerea JAK la o cantitate eficientă din cel puțin un compus selectat dintre compușii invenției.

Compușii invenției sunt utili ca inhibitori ai JAK care pot fi dozați oral și distribuiți specific la țesutul intestinal în timp ce se mențin expuneri sistemice reduse. Acest lucru este în contrast cu cei mai cunoscuți inhibitori ai JAK care sunt dozați oral și distribuiți la multe țesuturi din cauza faptului că ei au o expunere sistemică extensivă.

- 5 Tabelul 1a și Tabelul 1b prezintă rezultatele experimentelor *in vivo*. Aceste rezultate cuprind concentrațiile de țesut plasmatic și de colon pentru cincisprezece compuși care au fost administrați la șoareci cum s-a descris în Protocoalele 1, 2 sau 3. Rezultatele concentrației plasmatice și de colon au fost obținute urmând Protocolul 1 utilizând puncția venoasă a sângerării venei metatarsale dorsale pentru Compușii (B), (C), și Exemplele 6 și 11. Rezultatele concentrației plasmatice și de colon au fost obținute
- 10 urmând Protocolul 2 utilizând sângerarea retro-orbitală pentru Compușii (A), și Exemplele 1, și 3-5 și Protocolul 2 utilizând puncția venoasă a venei metatarsale dorsale pentru Exemplele 2, 7-10, și 12. Rezultatele Protocoalelor 1 și 2 sunt prezentate în Tabelul 1a. Rezultatele concentrației plasmatice și de colon au fost obținute urmând Protocolul 3 pentru Exemplele 1,3 și 4. Rezultatele Protocolului 3 sunt prezentate în Tabelul 1b. Aceste protocoale sunt descrise mai jos sub titlul Studii *in vivo*.
- 15 Tabelul 1a. Rezultatele experimentelor *in vivo* după dozarea p.o. – concentrația medie a compușilor testați

Compus de testat	Concentrația în plasmă după dozarea p.o. (ng/mL)						Concentrația de colon după dozarea p.o. (ng/g)	
	Timp = 0,5 h		Timp = 2 h		Timp = 4 h		Timp = 4 h	
	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std
A	347,0	78,5	69,1	40,8	84,5	25,5	895,0	260,6
B	352,7	85,7	66,3	26,2	11,3	3,7	6076,7	3125,8
C	547,0	71,4	130,2	63,7	16,7	5,9	7776,7	3500,2
Ex. 1	13,4	1,5	6,1	3,7	3,3	1,2	8591,7	10245,7
Ex. 2	24,5	3,6	4,2	1,8	1,3	0,1	7600,0	983,6
Ex. 3	41,4	15,1	3,9	0,7	1,5**	***	2147,2	1821,6
Ex. 4	12,9	1,6	7,5	2,8	3,3	1,5	4448,3	989,3
Ex. 5	31,9	5,1	8,8	1,7	6,0	1,2	5328,3	986,0
Ex. 6	18,8	20,6	3,0	0,9	1,7 [#]	^{##}	11706,7	11305,2
Ex. 7	47,0	3,8	9,6	4,4	5,0	1,2	12008,3	9461,1
Ex. 8	43,1	8,7	5,4	0,6	2,6	0,6	7396,7	3037,3
Ex. 9	15,1	1,8	6,2	4,5	3,9	0,9	7683,3	230,9
Ex. 10	26,6	4,0	3,2	1,0	3,1	0,7	3005,0	1347,2
Ex. 11	1,6**	***	^	^^	^	^^	4785,0	1059,9
Ex. 12	15,6	8,7	4,2	1,4	2,3	1,0	5885,0	3154,1

*Medie calculată din valorile obținute de la trei șoareci în afară de cazul când s-a notat altfel.

**Media a fost calculată cu valorile obținute de la doi șoareci deoarece valorile obținute de la al treilea șoarece au fost sub limita inferioară de cuantificare.

***Nici o deviație standard calculată deoarece media a fost calculată din numai două valori.

[#]Medie dată ca valoarea obținută de la un șoarece deoarece valorile obținute de la al doilea și al treilea șoarece au fost sub limita inferioară de cuantificare.

^{##}Nici o deviație standard calculată în lumina notei # din acest tabel.

^Media nu a fost calculată deoarece valorile pentru toți trei șoarecii au fost sub limita inferioară de cuantificare.

^^Nici o deviație standard calculată în lumina notei ^ din acest tabel.

Tabelul 1b. Rezultatele experimentelor in vivo după dozarea i.c. – concentrația medie a compușilor testați

Compus de testat	Concentrația în plasmă după dozarea i.c. (ng/mL)						Concentrația de colon după dozarea i.c. (ng/g)	
	Timp = 0,5 h		Timp = 2 h		Timp = 4 h		Timp = 4 h	
	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std	Medie*	Deviație std
Ex. 1	2,5 [#]	##	^	^^	^	^^	681,0	437,0
Ex. 3	1,5 [#]	##	^	^^	^	^^	227,8	254,1
Ex. 4	3,8**	***	2,5 [#]	##	^	^^	26,1 [#]	##

*Medie calculată din valorile obținute de la trei șoareci în afară de cazul când s-a notat altfel.

**Media a fost calculată cu valorile obținute de la doi șoareci deoarece valorile obținute de la al treilea șoarece au fost sub limita inferioară de cuantificare.

***Nici o deviație standard calculată deoarece media a fost calculată din numai două valori.

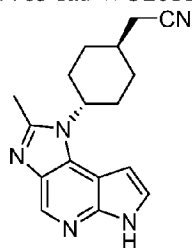
[#]Medie dată ca valoarea obținută de la un șoarece deoarece valorile obținute de la al doilea și al treilea șoarece au fost sub limita inferioară de cuantificare.

##Nici o deviație standard calculată în lumina notei # din acest tabel.

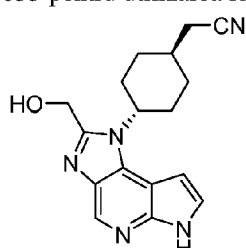
^Media nu a fost calculată deoarece valorile pentru toți trei șoarecii au fost sub limita inferioară de cuantificare.

^^Nici o deviație standard calculată în umina notei ^ din acest tabel.

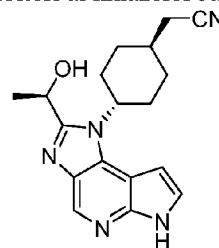
Compușii (A) - (C) sunt următorii compuși de referință care au fost divulgați în WO2013/007765 sau WO2011/086053 pentru utilizarea lor ca inhibitori ai kinazelor Janus:



(A)



(B)



(C)

Compușii din Ex. 1-12 din Tabelele 1a și 1b sunt realizări ale acestei invenții date în respectivele Exemple.

Cum s-a dovedit în Tabelul 1a, concentrațiile de colon pentru compușii din Ex. 1-12 au fost găsite ca fiind mult mai ridicate decât respectivele concentrații plasmatice, cu rapoarte ale concentrației [colon (4 h)] : [plasmă (0,5 h)] care variază de la aproximativ 52 până la aproximativ 3.000. În schimb, astfel de rapoarte pentru compușii (A) - (C) au variat de la aproximativ 3 până la aproximativ 17. Tabelul 1b furnizează de asemenea date de susținere că Exemplele 1, 3 și 4 au expuneri sistice reduse după dozarea i.c.. Contrastul între proprietățile realizărilor acestei invenții cu privire la compușii de referință este mult mai accentuat când comparația se referă la valorile de concentrație plasmatică la 4 h. În această privință, rapoartele de concentrație [colon (4 h)] : [plasma (4 h)] pentru compușii din Ex. 1-12 variază de la aproximativ 888 până la aproximativ 6886. În schimb, astfel de rapoarte pentru compușii (A) - (C) variază de la aproximativ 11 până la aproximativ 538. Aceste rapoarte de concentrație colon-la-plasmă sunt indicatori ai compușilor din Ex. 1-12 că au efecte sistice reduse la orice moment post doză orală, în timp ce compușii (A) - (C) au comparativ efecte sistice ridicate. Aceasta este o descoperire neașteptată a efectelor GI locale pentru compușii din Ex. 1-12.

Așa cum se arată în Tabelul 4, activitatea enzimatică a compușilor din Ex. 1-12 a fost măsurată pentru a determina activitatea pentru fiecare enzimă individuală. Pentru toți compușii testați, a fost măsurată inhibarea activității enzimei, demonstrând că acești compuși sunt inhibitori pan-JAK. Datele date în acest tabel pentru compușii (A) - (C) demonstrează de asemenea inhibarea activității enzimei pentru toate proteinele JAK de către acești compuși.

Așa cum se arată în Tabelul 5, activitățile celulare ale compușilor din Ex. 1-12 au fost evaluate în celulele mononucleare ale sângelui periferic (PBMC) utilizând stimuli IL-2, IFN- α și GM-CSF și

măsurând inhibarea fosforilării de STAT5, STAT4, și STAT5, respectiv. Pentru toți compușii testați, s-a măsurat inhibarea fosforilării STAT cu toți cei trei stimuli.

Așa cum se arată în Tabelul 6, solubilitățile compușilor din Ex. 1-12 au fost măsurate în fluid gastric simulat („SGF”) și fluid intestinal simulat („SIF”). Toți compușii testați au prezentat solubilitate măsurabilă peste 400 μ M în SGF, și în intervalul de la 81 μ M până peste 400 μ M cu SIF. Așa cum se arată în același tabel, aceste date de solubilitate au fost comparabile cu solubilitățile compușilor (A) - (C).

Așa cum se arată în Tabelul 7, permeabilitatea compușilor (A) - (C) și din Ex. 1-12 a fost măsurată utilizând linia celulară MDCK-MDR1 cu și fără elacridar, un inhibitor P-gp. Toți compușii au demonstrat permeabilitate redusă pentru măsurătorile de transport apical-la-bazolateral, cu și fără inhibitor P-gp (elacridar). Valorile coeficientului de permeabilitate pentru compușii (A) - (C) și Ex. 1-12 au fost reduse și comparabile cu cele ale transportului apical-la-bazolateral fără elacridar (pentru toți astfel de compuși) și cu elacridar (pentru compușii (B) - (C) și compușii din Ex. 1-12) (coloanele 2 și 3 într-un astfel de tabel), dar coeficienții de permeabilitate bazolateral-la-apical pentru compușii (A) - (C) au fost mai mari decât cei pentru majoritatea compușilor din Ex. 1 - 12, așa cum se arată în coloana 4 a aceluiași tabel. Cu referire la coloanele 3 și 4 din Tabelul 7, majoritatea compușilor din Ex. 1-12 au coeficienți de permeabilitate apical-la-bazolateral reduși măsuirați în prezența elacridarului (coloana 3), și de asemenea coeficienți de permeabilitate bazolateral-la-apical reduși (coloana 4). Aceste două caracteristici caracterizează astfel de compuși ca fiind compuși cu permeabilitate redusă. Aceeași caracterizare nu poate fi făcută pentru compușii (A) - (C), ai căror coeficienți de permeabilitate bazolateral-la-apical (coloana 4) sunt mai mari decât cei pentru majoritatea compușilor din Ex. 1 - 12. Rapoartele de eflux date în același tabel pentru compușii (A) - (C) și Ex. 1-12 arată că toți acești compuși sunt substraturi P-gp.

Nu există nici o referință sau sugestie cunoscute care să arate că lipsa marcată a efectelor sistemice pentru realizările acestei invenții în comparație cu cele ale compușilor de referință (A) - (C) poate fi dedusă și/sau prezisă pe baza comparațiilor structurale sau altor caracteristici ale compușilor (A) - (C) cum ar fi cele discutate cu referire la Tabelele 4, 6 și 7. Acest lucru este așa chiar dacă compușii de referință (A) - (C) prezintă similarități structurale ale anumitor radicali cu radicali similari ai realizărilor acestei invenții.

În plus, nu există nici o referință sau sugestie cunoscute care să arate că, caracteristica de permeabilitate redusă pentru realizările acestei invenții în comparație cu cele ale compușilor de referință (A) - (C) poate fi dedusă și/sau prezisă pe baza comparațiilor structurale.

Următoarele exemple specifice sunt furnizate pentru a ilustra mai departe invenția și diferite realizări.

În obținerea compușilor descriși în exemplele de mai jos și datele analitice corespunzătoare, au fost urmate următoarele protocoale experimentale și analitice, dacă nu s-a indicat altfel.

Dacă nu se afirmă altfel, amestecurile de reacție au fost agitate magnetic la temperatura camerei (rt). Unde soluțiile sunt „uscate”, ele sunt în general uscate pe un agent de uscare cum ar fi Na_2SO_4 sau MgSO_4 . Unde amestecurile, soluțiile, și extractele au fost „concentrate”, ele au fost de obicei concentrate pe un evaporator rotativ sub presiune redusă.

Cromatografia cu strat dublă a fost efectuată utilizând gel de siliciu Merk 60 F₂₅₄ 2,5 cm $\times$ 7,5 cm, 250 μ m sau plăci cu gel de siliciu precoperite 5,0 cm $\times$ 10,0 cm, 250 μ m.

Cromatografia rapidă pe coloană cu fază normală (FCC) a fost efectuată pe gel de siliciu (SiO_2) eluând cu 2 M NH_3 în MeOH/DCM, în afară de cazul când s-a notat altfel.

Spectrele de masă (MS) au fost obținute pe un Agilent seria 1100 MSD utilizând ionizarea prin electropulverizare (ESI) în mod pozitiv dacă nu s-a indicat altfel. Masa calculată (calculat.) corespunde cu masa exactă.

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară (RMN) au fost obținute pe spectrometre Bruker model DRX. Formatul datelor ^1H RMN de mai jos este: deplasare chimică în ppm în josul referinței de tetrametilsilan (multiplicitate, constantă de cuplare J în Hz, integrare).

Denumirea chimică a fost generată fie prin ChemDraw (CambridgeSoft, Cambridge, MA) sau fie prin ACD/Numere versiunea 9 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canada). Cu titlu de exemplu, denumirea (1*r*,4*r*) se referă la orientarea trans în jurul inelului de ciclohexil cum a fost generat utilizând funcția de denumire a Chemdraw Ultra Pro 14.0.

Pentru a furniza o descriere mai concisă, unele din expresiile cantitative date aici nu sunt calificate cu termenul „aproximativ”. Se înțelege că, dacă termenul „aproximativ” este utilizat explicit sau nu, fiecare cantitate dată aici este înțeleasă că se referă la valoarea actuală dată, și este de asemenea înțeleasă că se referă la aproximarea unei astfel de valori date care ar fi dedusă rezonabil pe baza calificării obișnuite în domeniu, incluzând echivalenți și aproximări din cauza condițiilor experimentale și/sau de măsurare pentru o astfel de valoare dată.

Ori de câte ori un randament este dat ca procentaj, un astfel de randament se referă la o masă a entității pentru care randamentul este dat față de cantitatea maximă a aceleiași entități care ar putea fi

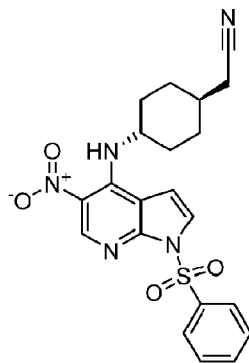
obținută sub anumite condiții stoechiometrice. Concentrațiile de reactiv care sunt date ca procentaje se referă la rapoarte de masă, în afară de cazul când se indică altfel.

Abrevierile și acronimele utilizate aici le includ pe următoarele așa cum se arată mai jos:

Abrevieri și acronime definite

Acronim	Termen
AAC	Condiții de îmbătrânire accelerată (40°C și 70% RH)
ACN	Acetonitril
aq	Apoasă
br	Larg
cLogP	LogP calculat
DCM	Diclorometan
DIPEA, DIEA, sau Hunig's bază	Diizopropiletilamină
DMA	Dimetilacetamidă
DMF	N,N-Dimetilformamidă
DMPU	1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinonă
DMSO	Dimetil sulfoxid
EtOAc, sau EA	Acetat de etil
EtOH	Etanol
ESI	Ionizare prin electropulverizare
FCC	Cromatografie rapidă pe coloană cu gel de siliciu cu faza normală
g	Gram
h	Oră
HPLC	Cromatografie de lichide cu presiune ridicată
ORE-XRPD	Difracție cu raze X pe pulbere de înaltă rezoluție
HT-XRPD	Difracție cu raze X pe pulbere cu randament ridicat
IPA	Izopropanol
i.c.	Intra-colonic
Hz	Hertz
LCMS	Cromatografie de lichide și spectrometrie de masă
M	Molar
m/z	Raport masă la încărcare
MeOH	Metanol
mg	Miligram
min	Minut
mL	Mililitru
μL	Microlitru
mmol	Milimol
MTBE	Metil <i>terț</i> -butil eter
MS	Spectrometrie de masă
RMN	Rezonanță magnetică nucleară
p.o.	<i>per os</i> sau pe gură
ppm	Părți per milion

Acronim	Termen
PTFE	Politetrafluoroetilen
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-oxitripirolidinofosfoniu
PyBrOP	Hexafluorofosfat de bromotripirolidinofosfoniu
RH	Umiditate relativă
R _t	Timp de retenție
Rt sau RT	Temperatura camerei
TFA	Acid trifluoroacetic
THF	Tetrahidrofuran
TLC	Cromatografie în strat subțire
tPSA	Aria suprafeței polare topologice

Sinteza și caracterizarea intermediarului 1:**2-((1*r*,4*r*)-4-((5-Nitro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil) acetonitril**

5

Etapa A: N-[(1*r*,4*r*)-4-(Hidroximetil)ciclohexil]carbamat de *terț*-butil. La un flacon purjat cu fund rotund cu 4 gâturi de 20-L și menținut cu o atmosferă inertă de azot s-a plasat acid (1*r*,4*r*)-4-[(*terț*-butoxi)carbonil]amino]ciclohexan-1-carboxilic (1066 g, 4,38 mol, 1,00 echiv) și THF (10 L). Acesta a fost urmat de adăugarea în picătură de BH₃-Me₂S (10 M, 660 mL) la -10°C timp de 1 oră. Soluția rezultată a fost agitată timp de 3 ore la 15°C. Această reacție a fost efectuată de trei ori în paralel și amestecurile de reacție au fost combinate. Reacția a fost apoi stinsă prin adăugarea de metanol (2 L). Amestecul rezultat a fost concentrat sub vid. Acest lucru a condus la N-[(1*r*,4*r*)-4-(hidroximetil)ciclohexil]carbamatul de *terț*-butil (3000 g, 99,6%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₁₂H₂₃NO₃, 229,32; m/z găsită, 215,2 [M-*t*Bu+MeCN+H]⁺; ¹H RMN: (300 MHz, CDCl₃): δ 4,40 (s, 1H), 3,45 (d, J= 6,3 Hz, 2H), 3,38 (s, 1H), 2,05-2,02 (m, 2H), 1,84-1,81 (m, 2H), 1,44 (s, 11H), 1,17-1,01 (m, 4H).

Etapa B: N-[(1*r*,4*r*)-4-[(Metansulfoniloxi)metil]ciclohexil]carbamat de *terț*-butil. La un flacon purjat cu fund rotund de 20 L cu 4 gâturi și menținut cu o atmosferă inertă de azot, au fost plasate N-[(1*r*,4*r*)-4-(hidroximetil)ciclohexil]carbamat de *terț*-butil (1000 g, 4,36 mol, 1,00 echiv.), diclorometan (10 L), piridină (1380 g, 17,5 mol, 4,00 echiv.). Acestea au fost urmate de adăugarea în picătură de MsCl (1000 g, 8,73 mol, 2,00 echiv.) la -15°C. Soluția rezultată a fost agitată peste noapte la 25°C. Această reacție a fost efectuată în paralel de 3 ori și amestecurile de reacție au fost combinate. Reacția a fost apoi stinsă prin adăugarea de 2 L de apă. Faza apoasă a fost extrasă cu acetat de etil (1 × 9 L). Stratul organic a fost separat și spălat cu 1 M HCl (3 × 10 L), NaHCO₃ (saturată apoasă) (2 × 10 L), apă (1 × 10 L) și saramură (1 × 10 L). Amestecul a fost uscat pe sulfat de sodiu anhidru, filtrat și concentrat sub vid. Acest lucru a condus la N-[(1*r*,4*r*)-4-[(metansulfoniloxi)metil]ciclohexil]carbamatul de *terț*-butil (3300 g, 82%) ca solid alb. LC-MS: MS (ESI): masă calc. pentru C₁₃H₂₅NO₅S, 307,15; m/z găsită 292,1, [M-*t*Bu+MeCN+H]⁺; ¹H RMN: (300 MHz, CDCl₃): δ 4,03 (d, J= 6,6 Hz, 2H), 3,38 (s, 1H), 3,00 (s, 3H), 2,07-2,05 (m, 2H), 1,87-1,84 (m, 2H), 1,72-1,69 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,19-1,04 (m, 4H).

Etapa C: N-[(1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil]carbamat de *terț*-butil. La un flacon cu fund rotund, cu 4 gâturi, de 10 L, s-au plasat N-[(1*r*,4*r*)-4-[(metansulfoniloxi)metil]ciclohexil]carbamat de *terț*-butil (1100 g, 3,58 mol, 1,00 echiv.), DMSO (5500 mL) și NaCN (406 g, 8,29 mol, 2,30 echiv.). Amestecul rezultat a fost agitat timp de 5 ore la 90°C. Această reacție a fost efectuată în paralel de 3 ori și amestecurile de reacție au fost combinate. Reacția a fost apoi stinsă prin adăugarea a 15 L de apă/gheață.

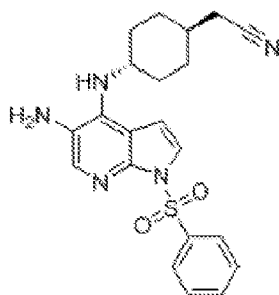
Solidele au fost colectate prin filtrare. Solidele au fost spălate cu apă (3×10 L). Acest lucru a condus la *N*-[(1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil]carbamatul de *terț*-butil (2480 g, 97%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru $C_{13}H_{22}N_2O_2$, 238,17; *m/z* găsită 224 $[M-tBu+MeCN+H]^+$; 1H RMN: (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4,39 (s, 1H), 3,38 (s, 1H), 2,26 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,08-2,04 (m, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,67-1,61 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,26-1,06 (m, 4H).

Etapa D: clorhidrat de 2-[(1*r*,4*r*)-4-aminociclohexil]acetonitril. La un flcon cu fund rotund de 10-L s-au plasat *N*-[(1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil]carbamatul de *terț*-butil (620 g, 2,60 mol, 1,00 echiv.), și 1,4-dioxan (2 L). Acestea au fost urmate de adăugarea unei soluții de HCl în 1,4-dioxan (5 L, 4 M) în picătură cu agitare la 10°C. Soluția rezultată a fost agitată peste noapte la 25°C. Această reacție a fost efectuată de 4 ori și amestecurile de reacție au fost combinate. Solidele au fost colectate prin filtrare. Solidele au fost spălate cu 1,4-dioxan (3×3 L), acetat de etil (3×3 L) și hexan (3×3 L). Acest lucru a condus la clorhidratul de 2-[(1*r*,4*r*)-4-aminociclohexil]acetonitril (1753 g, 96%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru $C_8H_{14}N_2$, 138,12; *m/z* găsită 139,25, $[M+H]^+$; 1H RMN: (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8,14 (s, 3H), 2,96-2,84 (m, 1H), 2,46 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H), 1,98 (d, *J* = 11,1 Hz, 2H), 1,79 (d, *J* = 12,0 Hz, 2H), 1,64-1,49 (m, 1H), 1,42-1,29 (m, 2H), 1,18-1,04 (m, 2H).

Etapa E: 2-((1*r*,4*r*)-4-((5-Nitro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil)acetonitril. La un balon de 1000 mL cu fund rotund conținând clorhidrat de 2-[(1*r*,4*r*)-4-aminociclohexil]acetonitril (29,10 g, 166,6 mmol) s-a adăugat DMA (400 mL). Suspensia rezultată a fost tratată cu 4-cloro-5-nitro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridină (51,53 g, 152,6 mmol), urmată de DIPEA (63,0 mL, 366 mmol). Amestecul de reacție a fost plasat sub N_2 și încălzit la 80°C timp de 4 ore. Amestecul de reacție brut a fost răcit la temperatura camerei și turnat încet într-un flacon de 2 L agitat viguros conținând 1,6 L apă. Suspensia rezultată a fost agitată timp de 15 minute la temperatura camerei, apoi filtrată și uscată timp de 16 ore într-un cuptor cu vid cu încălzire la 70°C pentru a furniza compusul din titlu (63,37 g, 95%) ca solid galben. MS (ESI): masă calc. pentru $C_{21}H_{21}N_5O_4S$, 439,1; *m/z* găsită, 440,1 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9,10 (s, 1H), 8,99 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 8,23 - 8,15 (m, 2H), 7,66 - 7,59 (m, 2H), 7,56 - 7,49 (m, 2H), 6,67 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 3,95 - 3,79 (m, 1H), 2,38 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,32 - 2,21 (m, 2H), 2,08 - 1,98 (m, 2H), 1,88 - 1,76 (m, 1H), 1,60 - 1,32 (m, 4H).

Sinteza și caracterizarea intermediarului 2:

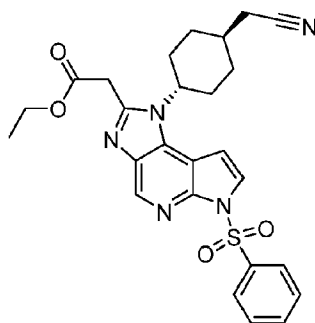
2-((1*r*,4*r*)-4-((5-Amino-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil)acetonitril



2-((1*r*,4*r*)-4-((5-Nitro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil)acetonitrilul (intermediarul 1, 58,60 g, 133,3 mmol) a fost dizolvat în THF/MeOH (1:1, 4800 mL). Amestecul a fost trecut printr-un reactor de hidrogenare cu flux continuu (10% Pd/C), cum ar fi un Thales Nano H-Cube®, la 10 mL/min cu 100% hidrogen (presiune atmosferică, 80°C), apoi soluția a fost concentrată pentru a furniza produsul ca solid purpuriu. Solidul a fost triturat cu EtOAc (400 mL) și apoi triturat din nou cu MeOH (200 mL) apoi filtrat și uscat sub vid pentru a furniza compusul din titlu (50,2 g, randament 91,9%). MS (ESI): masă calc. pentru $C_{21}H_{23}N_5O_2S$, 409,2; *m/z* găsită, 410,2 $[M+H]^+$. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,10 - 8,03 (m, 2H), 7,76 (s, 1H), 7,51 - 7,43 (m, 1H), 7,43 - 7,34 (m, 3H), 6,44 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 3,65 - 3,51 (m, 1H), 2,74 (s, 2H), 2,26 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,19 - 2,05 (m, 2H), 1,97 - 1,86 (m, 2H), 1,76 - 1,59 (m, 1H), 1,33 - 1,12 (m, 4H).

Sinteza și caracterizarea intermediarului 3:

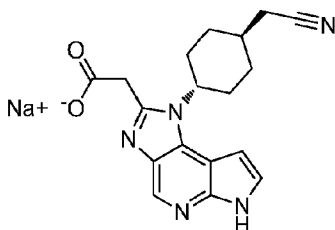
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de etil



La un balon de 1L cu fund rotund conținând o bară de agitare și 2-((1*r*,4*r*)-4-((5-amino-1-(fenilsulfonil)-1H-pirol[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil)acetat de etil (intermediarul 2, 58,31 g, 142,4 mmol) s-a adăugat 3-etoxi-3-iminopropanoat de etil (60,51 g, 309,3 mmol), urmat de EtOH (600 mL, uscat pe site moleculare de 3 Å timp de 48 ore). Un condensator de reflux a fost atașat la flaconul de reacție, reacția a fost purjată cu N₂, și a fost încălzită la 90°C timp de 9 ore. Amestecul de reacție a fost răcit la temperatura camerei și lăsat să stea timp de 30 ore unde produsul a cristalizat ca ace maro. Solidele au fost rupte cu o spatulă și amestecul de reacție a fost transferat într-un flacon de 2 L. S-a adăugat apă (1,4 L) încet prin pâlnie separatoare cu agitare viguroasă. După ce adăugarea apei a fost completă, suspensia a fost agitată timp de 30 minute. Acele maro au fost izolate prin filtrare și apoi uscate prin tragerea aerului prin filtru timp de 1 oră. Produsul a fost transferat la un flacon de 500 mL și tratat cu EtOAc (200 mL). S-a adăugat o cantitate mică de cristale de însămânțare, care au indus formarea unui precipitat solid alb. Suspensia a fost agitată timp de 30 minute la temperatura camerei, filtrată, clătită cu EtOAc (25 mL), și uscată sub vid pentru a furniza produsul ca solid alb (48,65 g, randament 68%). MS (ESI): masă calc. pentru C₂₆H₂₇N₅O₄S, 505,2; m/z găsită, 506,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,85 (s, 1H), 8,28 - 8,19 (m, 2H), 7,84 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,61 - 7,53 (m, 1H), 7,52 - 7,43 (m, 2H), 6,84 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 4,32 (s, 1H), 4,20 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,09 (s, 2H), 2,44 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,40 - 2,27 (m, 2H), 2,16 (d, *J* = 13,3 Hz, 2H), 2,12 - 1,96 (m, 3H), 1,54 - 1,38 (m, 2H), 1,27 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

Sinteza și caracterizarea intermediarului 4:

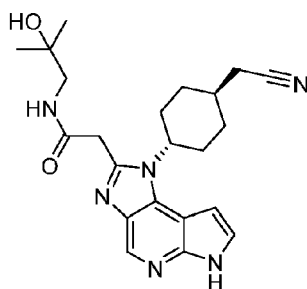
2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*] piridin-2-il)acetat de sodiu



La o soluție de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de etil (intermediarul 3,9,50 g, 18,8 mmol) în MeOH (30 mL) și THF (30 mL) s-a adăugat hidroxid de sodiu apos (56,4 mL, 56,4 mmol, 1 M) și s-a agitat la temperatura camerei timp de 14 ore. Solventul a fost îndepărtat sub presiune redusă la temperatura camerei pentru a furniza compusul din titlu (7 g) ca solid maro, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. MS (ESI): masă calc. pentru C₁₈H₁₈N₅NaO₂, 359,1; m/z găsită, 337,9 [M+H-Na]⁺. ¹H RMN (400MHz, CD₃OD) δ 8,52 - 8,47 (m, 1H), 7,85 - 7,81 (m, 2H), 7,46 - 7,41 (m, 4H), 6,85 - 6,81 (m, 1H), 4,60 - 4,46 (m, 1H), 3,96 (s, 2H), 2,59 - 2,49 (m, 4H), 2,19 - 2,05 (m, 6H), 1,56 - 1,43 (m, 2H) (un amestec 1:1 de compus din titlu și acid benzensulfonic).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 1:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*] piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă



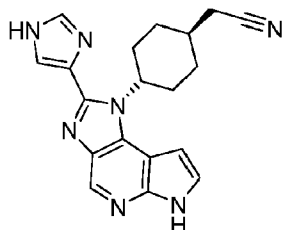
(Ex. 1)

Etapa A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă. Pentru a asigura materia primă uscată, 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetatul de etil (intermediarul 3) a fost încălzit sub vid la 50°C timp de 18 ore înainte de reacție. Într-un flacon de 1 L, 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetatul de etil (intermediarul 3, 52,585 g, 104,01 mmol) a fost suspendat în DMA (50 mL). S-a adăugat 1-amino-2-metilpropan-2-ol (50 mL) și reacția a fost încălzită la 110°C timp de 45 minute, apoi la 125°C timp de 5 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și diluată cu EtOAc (800 mL). Stratul organic a fost extras de trei ori cu o soluție de apă/saramură în care soluția a fost făcută din 1 L apă plus 50 mL saramură. Straturile apoase au fost extrase înapoi cu EtOAc (2 × 600 mL). Straturile organice combinate au fost uscate pe MgSO₄ anhidru, concentrate la sec, și apoi uscate timp de 3 zile sub vid pentru a furniza compusul din titlu (65,9 g, randament 98%) ca spumă galbenă. Produsul a fost luat în etapa următoare fără purificare suplimentară. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₈H₃₂N₆O₄S, 548,22; *m/z* găsită, 549,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,76 (s, 1H), 8,26 - 8,19 (m, 2H), 7,84 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,60 - 7,53 (m, 1H), 7,50 - 7,44 (m, 2H), 6,84 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 4,76 - 4,61 (m, 1H), 3,97 (s, 2H), 3,45 (s, 1H), 3,27 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,41 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,38 - 2,25 (m, 2H), 2,23 - 2,12 (m, 2H), 2,09 - 1,94 (m, 4H), 1,48 (qd, *J* = 13,6, 4,0 Hz, 2H), 1,21 (s, 6H).

Etapa B: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă. S-a adăugat 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă (65,90 g, 102,1 mmol) la un flcon de 1 L conținând o bară de agitare. S-a adăugat 1,4-dioxan (300 mL), urmat de KOH apos (3 M, 150 mL). Reacția a fost încălzită la 80°C timp de 2 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și volumul de solvent a fost redus până la aproximativ 200 mL pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost tratat cu o soluție de apă/saramură (100 mL/100mL), apoi extras cu 10% MeOH în CH₂Cl₂ (2 × 1L). Straturile organice au fost combinate, uscate pe MgSO₄ anhidru, și concentrate la sec pentru a furniza un solid galben. Solidul a fost suspendat în CH₂Cl₂ (200 mL), agitat viguros timp de 30 minute, și apoi colectat prin filtrare. Solidul a fost clătit cu CH₂Cl₂ (100 mL), uscat prin tragerea aerului prin filtru, și apoi uscat mai departe sub vid la temperatura camerei timp de 16 ore pentru a furniza compusul din titlu (41,59 g, randament 89%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₂H₂₈N₆O₂, 408,23; *m/z* găsită, 409,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,85 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,21 - 8,10 (m, 1H), 7,49 - 7,43 (m, 1H), 6,74 - 6,65 (m, 1H), 4,53 - 4,42 (m, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,08 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,58 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,41 - 2,28 (m, 2H), 2,09 - 1,92 (m, 5H), 1,42 - 1,31 (m, 2H), 1,09 (s, 6H). Sinteza și caracterizarea compusului activ al fiecăreia dintre realizările acestei invenții sunt furnizate aici în formă de exemple. Din cauza structurii cristalului unora din realizările acestei invenții, verificarea polimorfă poate fi urmărită pentru a caracteriza suplimentar formele specifice ale oricărui astfel de compus. Acest lucru este ilustrat într-o manieră nelimitativă pentru compusul din Ex. 1 prin exemplul de la titlul verificare polimorfă.

Sinteza și caracterizarea Exemplului 2:

2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il) ciclohexil)acetonitril



(Ex. 2)

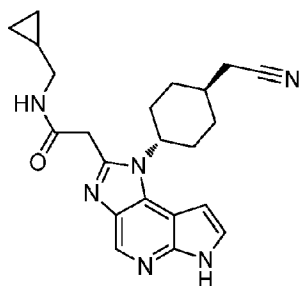
Etapa A: 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)-6-(fenilsulfonil)imidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril. 2-((1*r*,4*r*)-4-((5-Nitro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-pirolo[2,3-*b*]piridin-4-il)amino)ciclohexil)acetonitrilul (intermediarul 1, 23,3 g, 53,0 mmol) a fost adăugat într-un flacon cu fund

rotund de 1 L conținând o bară de agitare magnetică urmat de adăugarea de DMSO (200 mL) și metanol (200 mL). S-a adăugat ca solid 1H-imidazol-4-carbaldehidă (8,56 g, 89,1 mmol), urmată de adăugarea de hidrosulfid de sodiu (32,7 g, 188 mmol) ca soluție în apă (100 mL). Vasul de reacție a fost echipat cu un condensator de reflux și încălzit la 90°C într-un bloc de încălzire timp de 15 ore. Amestecul de reacție a fost apoi răcit la temperatura camerei și adăugat la un flacon conținând apă (2000 mL) cu agitare, care a condus la formarea unui precipitat alb. Amestecul a fost agitat timp de 30 minute și solidele au fost colectate prin filtrare. Solidele au fost uscate prin tragerea aerului prin filtru timp de 6 ore și apoi uscate mai departe într-un cuptor cu vid încălzit la 60°C timp de 3 zile pentru a furniza compusul din titlu (22,7 g, randament 88%) ca solid galben. MS (ESI): masă calc. pentru $C_{25}H_{23}N_7O_2S$, 485,16; m/z găsită, 486,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,74 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,20 - 8,11 (m, 2H), 8,04 - 7,96 (m, 2H), 7,76 - 7,68 (m, 1H), 7,68 - 7,60 (m, 2H), 7,19 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 5,56 (s, 1H), 2,58 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 2,38 - 2,24 (m, 2H), 2,07 (s, 1H), 1,98 (d, J = 10,8 Hz, 5H), 1,35 (q, J = 12,3 Hz, 2H).

Etapa B: 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1H-imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil)acetonitril. Compusul din titlu a fost preparat utilizând condiții analoage cu cele descrise în Exemplul 1, Etapa B utilizând 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1H-imidazol-4-il)-6-(fenilsulfonil)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril (222 mg, 0,46 mmol) în loc de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (0-15% 2 N NH₃-MeOH/EA) pentru a furniza compusul din titlu (97 mg, randament 69%). MS (ESI): masă calc. pentru $C_{19}H_{19}N_7$, 345,17; m/z găsită, 346,0 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,61 (s, 1H), 11,86 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,92 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,48 (t, J = 3,0 Hz, 1H), 6,76 (dd, J = 3,5, 1,8 Hz, 1H), 5,85 (s, 1H), 2,60 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 2,57 - 2,41 (m, 2H), 2,14 - 1,88 (m, 5H), 1,45 - 1,27 (m, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 3:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă



(Ex. 3)

Etapa A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]pyridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă. Un amestec de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo [4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de etil (intermediarul 3, 555 mg, 1,06 mmol) și ciclopropilmetilamină (1,87 mL, 21,1 mmol) a fost încălzit la 125°C timp de 1 oră într-un reactor cu microunde. Reziduul a fost tratat cu apă apoi extras cu acetat de etil. Straturile organice au fost combinate, uscate pe sulfat de sodiu, trecute printr-un dop de siliciu, și concentrate la sec utilizând un evaporator rotativ pentru a furniza compusul din titlu (642 mg). MS (ESI): masă calc. pentru $C_{28}H_{30}N_6O_3S$, 530,21; m/z găsită, 531,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,64 (s, 1H), 8,19-8,11 (m, 2H), 7,95 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 7,66-7,57 (m, 1H), 7,57-7,48 (m, 2H), 7,11 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 4,53 (s, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,07 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 2,53 (d, J = 5,9 Hz, 2H), 2,45-2,30 (m, 2H), 2,14-2,03 (m, 5H), 1,55 - 1,42 (m, 2H), 1,02-0,94 (m, 1H), 0,54-0,47 (m, 2H), 0,24-0,18 (m, 2H).

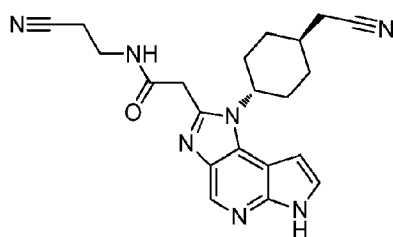
Etapa B: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*] pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă. La un amestec de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă (560 mg, 1,05 mmol) în 1,4-dioxan (4,22 mL) s-a adăugat 3N KOH (2,81 mL). Amestecul a fost încălzit la 80°C timp de 1 oră, apoi purificat cu HPLC bazic: coloană Xbridge Prep OBD C₁₈ 50 mm x100 mm, 5μm (eluent 0-100% NH₄OH apos/ACN (10 min)) pentru a furniza compusul din titlu (187 mg, randament 46%). MS (ESI): masă calc. pentru $C_{22}H_{26}N_6O$, 390,22; m/z găsită, 391,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,57 (s, 1H), 7,50 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,11 (s, 2H), 3,13 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 2,67-2,52 (m, 4H), 2,20-2,03 (m, 5H), 1,58- 1,44 (m, 2H), 1,12-0,97 (m, 1H), 0,60-0,48 (m, 2H), 0,31 - 0,22 (m, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 4:

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]

pirolo[2,3-

b]piridin-2-il)acetamidă



(Ex. 4)

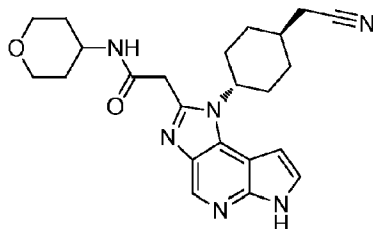
La o soluție de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d] pirolo[2,3-b]piridin-2-il)acetat de sodiu (intermediarul 4, 400 mg, 1,11 mmol) și 3-aminopropannitril (320 mg, 2,24 mmol) în DMF (5 mL) s-a adăugat PyBOP (870 mg, 1,67 mmol) și DIPEA (0,60 mL, 3,5 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 40 ore. După îndepărtarea DMF *in* vid, reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană utilizând 50-100% acetat de etil în heptan. Frațiunile colectate au fost concentrate *in* vid la un volum mic și solidul alb care a precipitat a fost separat prin filtrare, spălat cu 10% MeOH în CH₂Cl₂, și uscat pentru a furniza compusul din titlu (75 mg, randament 17%). Filtratul a fost concentrat la sec și purificat prin HPLC cu fază inversă utilizând o coloană Varian Pursuit XR₅ Difenil 100 mm × 30 mm (eluent 10 - 90% CH₃CN în apă, 0,1% TFA) pentru a furniza un ulei clar. Acest material a fost dizolvat în 10% MeOH în CH₂Cl₂, trecut prin trei coloane de 500 mg de carbonat SILICYCLE SPE-R66030B-03P (cartuș de extragere a fazei solide cu captator de acid SiliaBond) pentru a îndepărta TFA și elua cu 10% MeOH în CH₂Cl₂ pentru a furniza o fracțiune suplimentară a compusului din titlu (88 mg, randament 20%). Cele două fracțiuni au fost combinate pentru a furniza produsul final (163 mg, randament 37%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₁H₂₃N₇O, 389,20; m/z găsită, 390,3 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,53 (s, 1H), 7,48 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 4,51 (br s, 1H), 4,12 (s, 2H), 3,50 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,71 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,45 - 2,63 (m, 4H), 2,03 - 2,19 (m, 5H), 1,44 - 1,57 (m, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 5:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]

piridin-2-il)-N-

((tetrahidro-2H-piran-4-il)acetamidă



(Ex. 5)

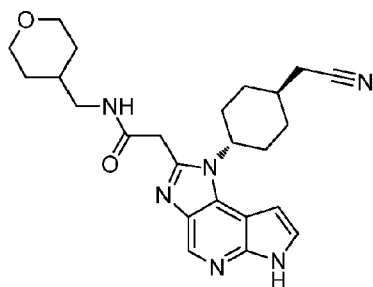
Un amestec de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonyl)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)acetat de etil (intermediarul 3,309 mg, 0,61 mmol) și 4-aminotetrahidropiran (195 mg, 1,93 mmol) în 1,4-dioxan (0,5 mL) a fost încălzit în un reactor cu microunde la 180°C timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu 1,4-dioxan (1,5 mL), tratat cu 3N KOH apos (2 mL), și încălzit la 80°C timp de 1,5 ore. Reziduul a fost apoi tratat cu apă (10 mL) și extras cu CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). Straturile organice au fost combinate, uscate pe MgSO₄ și concentrate *in* vid. Materialul brut a fost purificat utilizând cromatografie rapidă pe coloană (5-10% MeOH/CH₂Cl₂) pentru a da compusul din titlu (146 mg, randament 57%). MS (ESI): masă calc. pentru C₂₃H₂₈N₆O₂, 420,23; m/z găsită, 421,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,84 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,36 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 3,0 Hz, 1H), 6,73 - 6,67 (m, 1H), 4,54 - 4,41 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,86-3,81 (m, 2H), 3,81 - 3,74 (m, 1H), 3,40 - 3,34 (m, 2H), 2,60 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 2,41 - 2,29 (m, 2H), 2,10 - 2,01 (m, 1H), 2,00 - 1,93 (m, 4H), 1,77 - 1,70 (m, 2H), 1,49 - 1,33 (m, 4H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 6:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]

piridin-2-il)-N-

((tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)acetamidă

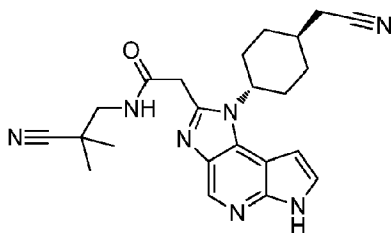


(Ex. 6)

La o fiolă la microunde s-au adăugat 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de etil (intermediarul 3, 300 mg, 0,593 mmol) și 4-aminometiltetrahidropiran (683 mg, 5,93 mmol). Soluția rezultată a fost agitată la 125°C timp de 1 oră. Apoi s-au adăugat dioxan (2,37 mL) și KOH (3 M în apă, 1,58 mL, 4,75 mmol) și reacția a fost agitată în microunde la 80°C timp de 1 oră. Reacția a fost purificată față de HPLC bazic utilizând o coloană Waters Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm, 5μm (eluent 0-100% apă (0,05% NH₄OH)/ACN (10 min)) pentru a furniza compusul din titlu (97 mg, randament 38%). MS (ESI): masă calc. pentru C₂₄H₃₀N₆O₂, 434,24; *m/z* găsită, 435,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8,43 (s, 1H), 7,38 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 4,43 (s, 1H), 4,03 - 3,96 (m, 2H), 3,89 - 3,79 (m, 2H), 3,34 - 3,25 (m, 2H), 3,04 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,54 - 2,38 (m, 4H), 2,08 - 1,96 (m, 5H), 1,74 - 1,63 (m, 1H), 1,59 - 1,54 (m, 2H), 1,46 - 1,33 (m, 2H), 1,25 - 1,14 (m, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 7:

***N*-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă**

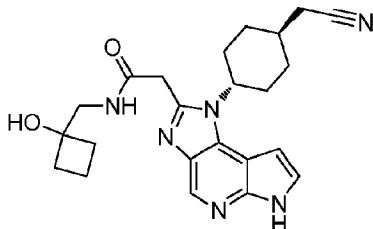


(Ex. 7)

O soluție 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de sodiu (intermediarul 4, 300 mg, 0,835 mmol), 3-amino-2,2-dimetilpropanitril (82,0 mg, 0,835 mmol), DIPEA (216 mg, 1,67 mmol), și DMF (5 mL) a fost agitată la 0°C timp de 1 oră. Apoi s-a adăugat PyBrOP (467 mg, 1,00 mmol) și amestecul de reacție a fost agitat peste noapte la temperatura camerei. Amestecul a fost stins cu 10 mL apă și a fost purificat prin HPLC preparativă utilizând o coloană Waters Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm 5μm (eluent: 28% apă (0,05% hidroxid de amoniac v/v)-ACN pentru a furniza compusul din titlu (58 mg, randament 16%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₃H₂₇N₇O, 417,23; *m/z* găsită, 418,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,86 (br s, 1H), 8,71 - 8,66 (m, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,48 - 7,45 (m, 1H), 6,73 - 6,69 (m, 1H), 4,53 - 4,42 (m, 1H), 4,10 (s, 2H), 3,33 - 3,31 (m, 1H), 2,57 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,41 - 2,27 (m, 2H), 2,05 - 1,93 (m, 5H), 1,45 - 1,26 (m, 9H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 8:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă



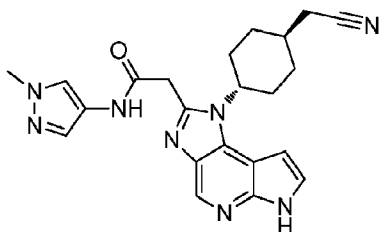
(Ex. 8)

O soluție de 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de sodiu (intermediarul 4, 300 mg, 0,835 mmol), 1-(aminometil)ciclobutanol (84,4 mg, 0,835 mmol), DIPEA (216 mg, 1,67 mmol), și DMF (5 mL) a fost agitată la 0°C timp de 1 oră. Apoi s-a adăugat PyBrOP (467 mg, 1,00 mmol) și s-a agitată la temperatura camerei peste noapte, apoi s-a stins cu 10 mL apă. Reacția a fost purificată prin HPLC preparativă bazică utilizând o coloană Kromasil 150

mm × 25 mm, 10μm (eluent: apă (0,05% hidroxid de amoniac v/v)-ACN de la 9% până la 39%, v/v) pentru a furniza compusul din titlu (90 mg, randament 26%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₃H₂₈N₆O₂, 420,23; m/z găsită, 421,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,58 (br s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,94 - 7,85 (m, 1H), 7,46 - 7,40 (m, 1H), 6,75 - 6,70 (m, 1H), 4,89 (br s, 1H), 4,57 - 4,47 (m, 1H), 4,04 (s, 2H), 3,27 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,55 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,45 - 2,31 (m, 2H), 2,10 - 1,88 (m, 9H), 1,71 - 1,60 (m, 1H), 1,54 - 1,35 (m, 3H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 9:

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetamidă

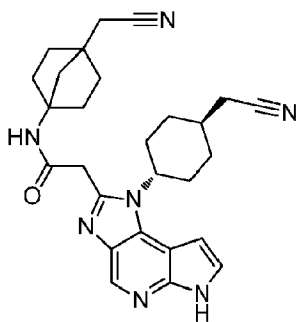


(Ex 9)

La o soluție de 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*] pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de sodiu (intermediarul 4, 100 mg, 0,278 mmol) și 1-metil-1*H*-pirazol-4-amină (54,0 mg, 0,557 mmol) în DMF (0,8 mL) s-au adăugat PyBrOP (217 mg, 0,417 mmol) și DIPEA (0,144 mL, 0,835 mmol) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. DMF a fost îndepărtat sub presiune redusă și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (50-100% EtOAc/heptani, apoi 10% MeOH/DCM) și ulterior prin HPLC cu fază inversă utilizând o coloană Varian Pursuit XR_s 5 Difenil 100 mm × 30 mm (eluent 10 - 90% CH₃CN în apă, 0,1% TFA) pentru a furniza produsul ca sare cu TFA. Acest material a fost dizolvat în 10% MeOH în CH₂Cl₂ și trecut printr-o coloană de 500 mg de carbonat SILICYCLE SPE-R66030B-03P (cartuș de extragere a fazei solide cu captator de acid SiliaBond) pentru a îndepărta TFA pentru a furniza compusul din titlu (34 mg, randament 29%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₂H₂₄N₈O, 416,21; m/z găsită, 417,3 [M+H]⁺. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ = 12,77 (br s, 1H), 11,24 (br s, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,89 (br s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,29 - 7,20 (m, 1H), 6,74 (br s, 1H), 4,85 - 4,65 (m, 1H), 4,23 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,80 - 2,55 (m, 1H), 2,45 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,32 - 1,98 (m, 6H), 1,62 - 1,44 (m, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 10:

***N*-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă**



(Ex. 10)

Etapă A: Ciclopentan-1,3-dicarboxilat de dimetil. O soluție de acid ciclopentan-1,3-dicarboxilic (70,0 g, 443 mmol) și metanol anhidru (300 mL) a fost răcită la 0°C într-o baie de gheață cu apă. S-a adăugat acid sulfuric concentrat (14 mL) în picătură, menținând temperatura la < 15°C. După adăugare, reacția a fost încălzită la 90°C și agitată peste noapte. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și concentrată la sec. Reziduul a fost tratat cu MTBE (500 mL) și H₂O (100 mL). Stratul apos a fost separat și extras cu MTBE (2 × 100 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu bicarbonat de sodiu saturat (2 × 100 mL), saramură (100 mL), uscate pe MgSO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec pentru a furniza compusul din titlu (72,5 g, 88%) ca ulei galben pal. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,65 (s, 6H), 2,84 - 2,72 (m, 2H), 2,26 - 2,17 (m, 1H), 2,11 - 2,02 (m, 1H), 1,96 - 1,88 (m, 4H).

Etapă B: Biciclo[2,2,1]heptan-1,4-dicarboxilat de dimetil. *n*-Butillitui (2,5 M în hexan, 419,0 mL, 1048 mmol) a fost adăugat încet la o soluție de diizopropilamină (152 mL, 1090 mmol) și THF anhidru (1000 mL) la -78°C (gheață uscată/acetona) sub N₂. Apoi, reacția a fost agitată timp de 0,5 ore la 0°C înainte de răcirea la -78°C. S-a adăugat DMPU (404 mL, 3350 mmol) printr-o pâlnie de adăugare. Apoi o soluție de ciclopentan-1,3-dicarboxilat de dimetil (78,0 g, 419 mmol) și THF anhidru (300 mL) a

fost adăugată încet printr-o pâlnie de adăugare. Reacția a fost încălzită la 0°C și agitată timp de 30 minute, apoi răcită la -78°C și tratată cu o soluție de 1-bromo-2-cloroetan (59,0 mL, 712 mmol) și THF anhidru (200 mL). Reacția a fost lăsată să se încălzească încet la temperatura camerei și a fost agitată timp de 12 ore la temperatura camerei. Reacția a fost stinsă cu clorură de amoniu apoasă saturată (400 mL). Reacția a fost diluată cu acetat de etil (500 mL), stratul organic separat, și stratul apos a fost extras suplimentar cu acetat de etil (2 × 500 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu saramură (2 × 300 mL), uscate pe MgSO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Reziduul a fost filtrat printr-un strat de gel de siliciu și spălat cu acetat de etil (2000 mL). Filtratul a fost concentrat la sec și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 30 :1 până la 20 :1, eluare gradient) pentru a furniza compusul din titlu (48,5 g, 54%) ca solid alb. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃): δ 3,69 (s, 6H), 2,08 - 1,99 (m, 4H), 1,91 (s, 2H), 1,73 - 1,63 (m, 4H).

Etapa C: Acid 4-(metoxycarbonil)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilic. O soluție de metanol (80 mL) de hidroxid de sodiu (5,145 g, 128,6 mmol) a fost adăugată încet la o soluție de biciclo[2,2,1]heptan-1,4-dicarboxilat de dimetil (27,3 g, 129 mmol) și THF (700 mL) la 0°C și amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. Reacția a fost concentrată la sec și reziduul a fost triturat cu MTBE (15 mL). Precipitatul a fost colectat prin filtrare, spălat cu MTBE (5 mL), și dizolvat în 100 mL de H₂O. Soluția a fost acidulată la pH = 4 cu 2 M HCl. Precipitatul a fost colectat prin filtrare și uscat sub vid pentru a furniza compusul din titlu (13,0 g, 51,0%) ca solid alb. Filtratul a fost extras cu acetat de etil (3 × 75 mL) și extractele organice combinate au fost spălate cu saramură (50 mL), uscate pe MgSO₄ anhidru, filtrate și concentrate la sec pentru a furniza o a doua fracțiune a compusului din titlu (8,0 g, 31%) ca solid alb. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,21 (br s, 1H), 3,59 (s, 3H), 1,94 - 1,86 (m, 4H), 1,74 (s, 2H), 1,61 - 1,54 (m, 4H).

Etapa D: 4-(((Benziloxi)carbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilat de metil. S-a adăugat difenilfosforil azidă (17,1 mL, 78,6 mmol) la o soluție de acid 4-(metoxycarbonil)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilic (13,0 g, 65,6 mmol), DIPEA (22,8 mL, 131 mmol), și toluen anhidru (200 mL) și amestecul de reacție a fost agitat la 110°C timp de 2 ore. Reacția a fost răcită la 50°C și s-a adăugat alcool benzilic (13,6 mL, 131 mmol) și amestecul de reacție a fost agitat la 110°C peste noapte. Reacția a fost concentrată la sec, dizolvată în MTBE (250 mL) și spălată cu H₂O (150 mL). Stratul organic a fost separat și stratul apos a fost extras cu MTBE (2 × 100 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu saramură (100 mL), uscate pe MgSO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 10:1 până la 5:1, eluare gradient) pentru a furniza un produs impur (28,5g) ca ulei galben pal. Produsul a fost purificat suplimentar cu HPLC acidică preparativă utilizând o coloană Fenomenex Synergi Max-RP 250 × 50 mm × 10 μm (eluente: 38% până la 68% (v/v) CH₃CN și H₂O cu 0,1% TFA). Frațiunile pure au fost combinate și volatilele au fost îndepărtate sub vid. Reziduul a fost diluat cu H₂O (80 mL), pH-ul soluției a fost ajustat la pH = 8 cu soluție de NaHCO₃ apoasă saturată, și soluția rezultată a fost extrasă cu CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu saramură (75 mL), uscate pe MgSO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec pentru a furniza compusul din titlu (17,3 g, 85%) ca ulei incolor. MS (ESI): masă calc. pentru C₁₇H₂₁NO₄, 303,2; m/z găsită, 303,9 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,56 (br s, 1H), 7,37 - 7,30 (m, 5H), 4,97 (s, 2H), 3,58 (s, 3H), 1,90 - 1,80 (m, 6H), 1,65 - 1,59 (m, 4H).

Etapa E: 4-(((*Terf*-butoxicarbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilat de metil. Un amestec de 4-(((benziloxi)carbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilat de metil (17 g, 56 mmol), dicarbonat de di-*terf*-butil (18,35 g, 84,06 mmol), MeOH (200 mL) și Pd/C umed (4 g, 10 g%, 50% H₂O) a fost adăugat la un flacon cu fund rotund de 500 mL cu un balon de hidrogen (13 psi) și a fost agitat la temperatura camerei timp de 72 ore. Catalizatorul a fost separat prin filtrare și filtratul a fost concentrat la sec. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 20 :1 până la 1:1, eluare gradient) pentru a furniza compusul din titlu (12,0 g, 79,5%) ca solid alb. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,04 (br s, 1H), 3,57 (s, 3H), 1,93 - 1,78 (m, 4H), 1,77 (s, 2H), 1,63 - 1,53 (m, 4H), 1,35 (s, 9H).

Etapa F: Acid 4-(((*terf*-butoxicarbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilic. La o soluție de 4-(((*terf*-butoxicarbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilat de metil (5,0 g, 19 mmol), THF (40 mL) și MeOH (20 mL) s-a adăugat hidroxid de sodiu apos (1,0 M, 46,4 mL, 46,4 mmol) la temperatura camerei și amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 24 ore. Reacția a fost concentrată la sec și reziduul a fost diluat cu H₂O (20 mL), acidulată la pH = 4 - 5 cu 2 M HCl pentru a furniza un precipitat. Precipitatul a fost dizolvat în 150 mL de acetat de etil, spălat cu saramură (45 mL), uscat pe Na₂SO₄ anhidru, filtrat, și concentrat la sec pentru a furniza compusul din titlu (4,74 g, randament 100%) ca solid alb, care a fost utilizat direct în etapa următoare. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,06 (br s, 1H), 7,00 (br s, 1H), 1,87 - 1,73 (m, 6H), 1,58 - 1,50 (m, 4H), 1,35 (s, 9H).

Etapa G: (4-(Hidroximetil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)carbammat de *terf*-butil. O soluție de complex boran-tetrahidrofuran (1,0 M, 37,1 mL, 37,1 mmol) a fost adăugată încet la o soluție de acid 4-(((*terf*-butoxicarbonil)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-carboxilic (4,74 g, 18,6 mmol) și THF anhidru (50 mL) la

0°C sub o atmosferă de azot. După ce adăugarea a fost completă, reacția a fost agitată la temperatura camerei peste noapte. S-a adăugat apă (30 mL) încet la amestec și acesta a fost agitat timp de 30 minute suplimentare. Reacția a fost concentrată la sec și reziduul a fost diluat cu acetat de etil (50 mL), spălat cu H₂O (15 mL) și saramură (10 mL), uscat pe Na₂SO₄ anhidru, filtrat, și concentrat la sec. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 2:1) pentru a furniza compusul din titlu (4,0 g, randament 89%) ca solid alb. TLC (eter de petrol/acetat de etil, 2:1), R_f = 0,5. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 6,88 (br s, 1H), 4,38 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 3,36 (d, J = 5,4 Hz, 2H), 1,73 (br s, 2H), 1,64 - 1,49 (m, 4H), 1,42 (s, 2H), 1,39 - 1,33 (m, 9H), 1,25 - 1,16 (m, 2H).

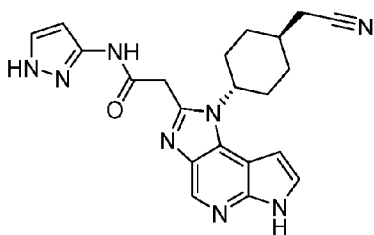
Etapa H: Metansulfonat de (4-((*terț-butoxicarbonil*)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)metil. S-a adăugat piridină (2,7 mL, 33 mmol) la o soluție de (4-(hidroximetil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)carbamate de *terț-butil* (2,0 g, 8,3 mmol) și H₂Cl₂ anhidru (30 mL). Reacția a fost răcită la 0°C și s-a adăugat clorură de metansulfonil (2,0 mL, 25,0 mmol) și amestecul a fost agitat timp de 3 ore la temperatura camerei. Reacția a fost diluată cu CH₂Cl₂ (50 mL) și apă (30 mL). Stratul organic a fost separat, spălat cu saramură (15 mL), uscat pe MgSO₄ anhidru, filtrat și concentrat la sec. Reziduul a fost purificat cu cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 5:1 până la 1:1, eluare gradient) pentru a furniza compusul din titlu (2,58 g, 97%) ca solid alb. TLC (eter de petrol/acetat de etil, 1:1), R_f = 0,85. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 4,73 (br s, 1H), 4,21 (s, 2H), 2,98 (s, 3H), 1,93 - 1,90 (m, 2H), 1,78 - 1,62 (m, 6H), 1,53 - 1,34 (m, 11H).

Etapa I: (4-(cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)carbamate de *terț-butil*. La o soluție de metansulfonat de (4-((*terț-butoxicarbonil*)amino)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)metil (2,58 g, 8,07 mmol) și DMSO (25 mL) s-a adăugat cianură de sodiu (1,20 g, 24,5 mmol). Reacția a fost încălzită până la 100°C și agitată timp de 24 ore. Reacția a fost diluată cu 50 mL de apă și extrasă cu acetat de etil (3 × 40 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu saramură (20 mL), uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (eter de petrol/acetat de etil, 5:1) pentru a furniza compusul din titlu (1,8 g, randament 89%) ca solid alb. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,00 (br s, 1H), 2,67 (s, 2H), 1,82 (br s, 2H), 1,69 - 1,52 (m, 6H), 1,47 - 1,40 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

Etapa J: Clorhidrat de 2-(4-aminobiciclo[2,2,1]heptan-1-il)acetonitril. La o suspensie de (4-(cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)carbamate de *terț-butil* (850 mg, 3,40 mmol) și acetat de etil (2 mL) la 0°C s-a adăugat o soluție de HCl în acetat de etil (4,0 M, 10 mL, 40 mmol). După agitare la temperatura camerei timp de 2 ore, amestecul a fost concentrat sub presiune redusă la sec. Reziduul a fost triturat cu MTBE (5 mL) și suspensia a fost izolată prin filtrare. Turta de filtru a fost spălată cu MTBE (1 mL) și uscată sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (450 mg, 71%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₉H₁₄N₂ 150,12 m/z, găsită 151,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,59 (br.s., 3H), 2,78 (s, 2H), 1,90 - 1,77 (m, 2H), 1,74 - 1,62 (m, 4H), 1,60 (s, 2H), 1,56 - 1,46 (m, 2H).

Etapa K: *N*-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil) ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă. La o soluție de 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il) acetat de sodiu (intermediarul 4, 300 mg, 0,835 mmol), clorhidrat de 2-(4-aminobiciclo[2,2,1]heptan-1-il)acetonitril (138 mg, 0,918 mmol), și DIPEA (0,291 mL, 1,67 mmol) în DMF uscat (6 mL) s-a adăugat PyBrOP (428 mg, 0,918 mmol) la 0°C. Reacția a fost agitată la temperatura camerei timp de 12 ore. Amestecul a fost stins cu 10 mL apă și a fost extras cu EtOAc (3 × 20 mL). Fazele organice combinate au fost spălate cu saramură, uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Reziduul a fost purificat prin HPLC preparativă (utilizând o coloana Xtimate C₁₈ 150 × 25 mm × 5 μm (eluente: 23% până la 33% (v/v) CH₃CN și H₂O cu 10 mM NH₄HCO₃) și prin TLC preparativă (diclorometan: metanol=15:1) pentru a furniza compusul din titlu (36,6 mg, randament 9%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru C₂₇H₃₁N₇O, 469,3; m/z găsită, 470,2 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,53 (s, 1H), 7,48 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 4,47 (br s, 1H), 4,07 - 4,02 (m, 2H), 2,63 (s, 2H), 2,61 - 2,50 (m, 4H), 2,18 - 1,98 (m, 7H), 1,94 - 1,84 (m, 2H), 1,82 (s, 2H), 1,79 - 1,68 (m, 2H), 1,62 - 1,43 (m, 4H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 11:
2-(1-((*Ir,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*] piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă



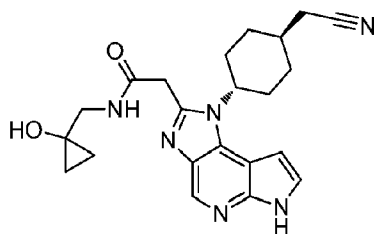
(Ex. 11)

Etapa A: 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă. Compusul din titlu (383 mg, 70%) a fost preparat într-un mod analog cu cel descris în Exemplul 1, Etapa A utilizând 1*H*-pirazol-3-amină (465 mg, 5,48 mmol) în loc de 1-amino-2-metilpropan-2-ol. MS (ESI): masă calc. pentru $C_{27}H_{26}N_8O_3S$, 542,2; *m/z* găsită, 543,2 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,36 (s, 1H), 11,36 (s, 1H), 10,81 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,14 - 8,10 (m, 2H), 7,96 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,72 - 7,68 (m, 1H), 7,63 - 7,60 (m, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,13 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 6,44 - 6,41 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,44 (s, 2H), 4,24 (s, 2H), 2,56 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,23 - 2,13 (m, 2H), 2,02 - 1,95 (m, 1H), 1,41 - 1,32 (m, 2H).

Etapa B: 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*] pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă. Compusul din titlu a fost preparat într-un mod analog cu Exemplul 1, Etapa B utilizând 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-6-(fenilsulfonil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă și purificând prin HPLC bazic utilizând o Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm, 5 μm, eluent 5% ACN/NH₄OH (apos) (10 min) pentru a furniza compusul din titlu (15 mg, 7%). MS (ESI): masă calc. pentru $C_{21}H_{22}N_8O$, 402,5; *m/z* găsită, 403,2 $[M+H]^+$. 1H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,35 (s, 1H), 11,85 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,58 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,47 - 6,39 (m, 1H), 4,64 - 4,46 (m, 1H), 4,21 (s, 2H), 2,57 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,45 - 2,26 (m, 2H), 2,08 - 1,88 (m, 5H), 1,39 (q, *J* = 11,7 Hz, 2H).

Sinteza și caracterizarea Exemplului 12:

2-(1-((*Ir,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*] piridin-2-il)-*N*-(1-hidroxipropil)metil)acetamidă



(Ex. 12)

O soluție de 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*] pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetat de sodiu (intermediarul 4, 300 mg, 0,835 mmol), 1-(aminometil)ciclopropanol (72,7 mg, 0,835 mmol), DIPEA (216 mg, 1,67 mmol), și DMF (5 mL) a fost agitată la 0°C timp de 1 oră. Apoi s-a adăugat PyBrOP (467 mg, 1,00 mmol) și s-a agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost stins cu 10 mL apă și a fost purificat prin HPLC bazică preparativă utilizând o coloană Kromasil 150 mm × 25 mm, 10 μm (eluent: apă (0,05% hidroxid de amoniac v/v)-ACN de la 5% până la 35%, v/v) pentru a furniza compusul din titlu (84 mg, randament 25%) ca solid alb. MS (ESI): masă calc. pentru $C_{22}H_{26}N_6O_2$, 406,21; *m/z* găsită, 407,2 $[M+H]^+$. 1H RMN (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,53 (br s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,03 - 7,93 (m, 1H), 7,44 - 7,40 (m, 1H), 6,74 - 6,71 (m, 1H), 5,04 (s, 1H), 4,58 - 4,49 (m, 1H), 4,02 (s, 2H), 3,29 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,55 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,45 - 2,31 (m, 2H), 2,10 - 1,97 (m, 5H), 1,50 - 1,37 (m, 2H), 0,62 - 0,55 (m, 2H), 0,55 - 0,48 (m, 2H).

Exemplu de verificare polimorfă

Unele realizări ale compușilor în conformitate cu această invenție ca baze libere prezintă multiple configurații cristaline care au un comportament complex în stare solidă, din care unele în schimb pot prezenta caracteristici distincte printre ele însele din cauza diferitelor cantități de solvent încorporate. Unele realizări ale compușilor în conformitate cu această invenție sunt în formă de pseudopolimorfe, care sunt realizări ale aceluiași compus care prezintă diferențe de compoziție ale structurii cristaline din cauza diferitelor cantități de solvent din structura cristalină înșiși. În plus, solvatarea canalului poate fi de asemenea prezentă în unele realizări cristaline ale compușilor în conformitate cu această invenție, în care solventul este încorporat în canalele sau golurile care sunt prezente în structura cristalină. De exemplu, diferitele configurații cristaline date în Tabelul 2 au fost găsite pentru compusul din Ex. 1. Datorită acestor caracteristici, solvații non-stoechiometrice au fost adesea observați, cum s-a ilustrat în Tabelul 2. Mai mult, prezența unor astfel de canale sau goluri în structura cristalină a unor realizări în conformitate cu această invenție permite prezența apei și/sau a moleculelor de solvent care sunt menținute în structura cristalină cu diferite grade ale forței de legătură. În consecință, modificările în condiții ambientale specifice pot conduce cu ușurință la unele pierderi sau câștiguri de molecule de apă și/sau de molecule de solvent în unele realizări în conformitate cu această invenție. Se înțelege că „solvatarea” (a treia coloană în Tabelul 2) pentru fiecare din realizările listate în Tabelul 2 este formula de solvatare, și că determinarea actuală a acestora ca număr stoichiometric (a patra coloană în Tabelul 2) poate varia puțin față de formula de solvatare depinzând de condițiile ambientale actuale când este determinată experimental. De exemplu,

dacă aproximativ jumătate din moleculele de apă dintr-o realizare pot fi prezente ca legături de hidrogen la compusul activ din structura cristalină, în timp ce aproximativ cealaltă jumătate din moleculele de apă poate fi în canalele sau golurile din structura cristalină, atunci modificările în condițiile ambientale pot altera cantitatea de astfel de molecule de apă conținute liber în goluri sau canale, și conduc prin urmare la o ușoară diferență între formula de solvatare care este atribuită în conformitate cu, de exemplu, difracția monocristalină, și stoichiometria care este determinată prin, de exemplu, analiză termogravimetrică cuplată cu spectroscopia de masă.

Tabelul 2. Realizări de forme cristaline ale compusului din Ex. 1

Realizare	Solvent cristalizare	Solvatare	Stoichiometrie
Is	-	monohidrat	0,8 H ₂ O
1a	Apă	monohidrat	1,3 H ₂ O
1b	Toluen	Solvat toluen	0,4 toluen
1c	Acetat de etil/1,4-dioxan	monohidrat	1,1 H ₂ O
1d	Acetonitril/cloroform	1,7 hidrat	1,7 H ₂ O
1e	Acetat de etil/1,4-dioxan	monohidrat	1 H ₂ O
1f	p-xilen	Solvat p-xilen	0,3 p-xilen
1f	Cumene	Solvat cumenă	0,3 cumene
1g	Anisol	Solvat anisol	0,3 anisol
1h	p-xilen	Solvat p-xilen	0,2 p-xilen
2	1,4-dioxan	Solvat 1,4-dioxan	1,2 1,4-dioxan
3b	Ciclohexanone	Solvat ciclohexanonă	0,3 Ciclohexanone
3c	1,4-dioxan	Solvat 1,4-dioxan	0,5 1,4-dioxan
3d	THF	Solvat THF	0,4 THF
3e	Izobutanol	Solvat izobutanol	0,7 izobutanol
1b+4	Apă/metanol	Solvat amestec hidrat/metanol	-
5	Cloroform	Solvat cloroform	0,5 cloroform
6	Acetonitril	Anhidru	0,2 acetonitril
1s+7	Heptan	Solvat heptan	0,1 heptan
7	-	Nesolvat	-
8	-	Nesolvat	-
9	-	Nesolvat	-
10		Dihidrat	1,8 H ₂ O

Compusul care a fost obținut cum s-a descris în Exemplul 1 a fost cristalizat în plus prin prepararea unei suspensii în DCM (1:3, de exemplu 10 g compus în 30 ml DCM) care a fost agitată la 40°C timp de 4 ore, și agitată în plus timp de 14 ore la 25°C, apoi s-a adăugat încet heptan (1:2, de exemplu 20 ml de heptan în compusul/DCM suspensie/soluție) la 25°C, s-a agitat la 40°C timp de 4 ore, s-a răcit la 25°C și s-a agitat timp de încă 14 ore suplimentare la 25°C. Filtrarea ulterioară a condus la compusul din Ex. 1 în forma unui solid alburiu, care a fost identificat ca monohidrat, o realizare Is.

Realizările 1 - 10 din Tabelul 2 și Fig. 2 sunt cristaline. Realizările 1s și 1a prin 1h sunt izostructurale. Realizarea Is cristalizează într-o grupare spațială triclinică centro-simetrică P-1. Termenul „realizarea 1” se referă colectiv la realizările izostructurale 1s și 1a prin 1h. Oricare dintre astfel de realizări 1s și 1a prin 1h este uneori referită ca un membru izostructural al realizării 1 sau doar ca un membru al realizării 1. Realizările 3b, 3c, 3d și 3e sunt izostructurale și cristalizează în sistem monoclinic, grup spațial C 2/c. Termenul „realizarea 3” se referă colectiv la realizările izostructurale 3b, 3c, 3d și 3e. Oricare dintre astfel de realizări 3b, 3c, 3d și 3e este uneori referită ca un membru izostructural al realizării 3 sau doar ca un membru al realizării 3. Realizările izostructurale sunt astfel încât ele posedă proprietăți similare ale structurii cristaline (aceleași simetrii și parametri similari ai celulei unitare și împachetarea cristalină) în timp ce au diferite compoziții chimice (*adică*, solvenți diferiți

și/sau molecule de apă încorporate în structura cristalină). Parametrii celulei unitare din realizările izostructurale pot diferi puțin din cauza diferitelor compoziții (solvent sau apă încorporate în structura cristalului). Realizările la care se face referire în Tabelul 2 au fost preparate și/sau interconvertite așa cum se arată schematic în Fig. 2 și cum s-a descris mai detaliat în următoarele tehnici de verificare.

Verificarea a inclus protocoale de cristalizare cum ar fi echilibrarea solventului în solvenții puri, cristalizarea evaporativă, cristalizarea prin răcire cu filtrare la cald, cristalizarea prin rupere cu anti-solvent, și cristalizarea prin termociclare. Solidele au fost analizate prin HT-XRPD. Când a fost cazul, lichidele mamă au fost evaporate complet și solidele rămase au fost de asemenea analizate prin HT-XRPD. Forma solidă predominantă care a fost identificată a fost realizarea materiei prime Is ca monohidrat.

Echilibrarea solventului la 25°C și 50°C

Experimentele cu suspensii pe termen lung au fost efectuate prin suspendarea realizării compusului Is în douăzeci de solvenți puri și agitarea la temperatura camerei timp de două săptămâni și la 50°C timp de o săptămână. După terminarea timpului de echilibrare, solidele reziduale au fost separate de lichidul mamă. Solidele au fost uscate sub condiții ambientale și uscate sub vid (5mBar) înainte de a fi analizate prin HT-XRPD. Ulterior, solidele au fost expuse la condiții de îmbătrânire accelerată (40°C/70% umiditate relativă) timp de două zile și analizate din nou prin HT-XRPD.

Din majoritatea solvenților de cristalizare, s-a obținut materia primă ca realizare Is. Din câțiva solvenți de cristalizare, tiparele HT-XRPD au fost găsite ca fiind similare cu cele ale realizării inițiale Is. În majoritatea acestor tipare de difracție, au fost identificate deplasările vârfurilor și/sau maximele suplimentare. Fiecare din aceste tipare au corespuns unei realizări care a fost etichetată ca una de la 1a până la 1h, și pe baza similarității în tiparele de difracție HT-XRPD pentru astfel de realizări, ele sunt prezentate ca realizări care sunt membri izostructurali ai realizării 1. Toți membrii izostructurali ai realizării 1 s-au convertit la realizarea 1a după expunerea la 40°C și 75% RH timp de două zile.

Realizarea Is s-a convertit la realizarea hidratată 10 când ea a fost expusă la 100% RH la 25°C. Totuși, realizarea 10 nu a fost fizic stabilă în condiții ambientale. În timp ce realizarea Is a cristalizat în sistem triclinic, grup spațial P-1, s-a descoperit că realizarea 10 cristalizează în sistem monoclinic, grup spațial C 2/c. Realizarea 10 a avut stabilitate fizică limitată în condiții ambientale și ea s-a convertit într-o altă realizare cum ar fi Is sau 1a. Acest comportament este atribuit unei legături puternice inegale a tuturor moleculelor de hidratare/solvatare. În acest caz, realizarea 10 ar avea o a doua moleculă de apă legată mai puțin puternic care s-ar pierde în condiții ambientale. Mai precis, stabilitatea fizică a realizării Is a fost investigată în camere climatice prin expunerea unei mostre de 20 mg a unei astfel de realizări la 40°C și 70% umiditate relativă timp de patru zile, și o altă mostră de 20 mg a aceleiași realizări a fost expusă de asemenea timp de patru zile la 25°C și 100% umiditate relativă. După patru zile, diferitele mostre solide au fost analizate prin HT-XRPD, parametrii celulei cristaline au fost determinați și difractogramele au fost indexate. Difractogramele sunt prezentate în Fig. 6. De jos în sus, prima difractogramă din Fig. 6 corespunde cu realizarea Is ca materie primă, și a doua corespunde cu aceeași formă după o expunere de 4 zile la 40°C și 70% umiditate relativă, notată ca „Is 70 RH” în aceeași figură. Această analiză a dezvăluit că realizarea inițială Is a fost recuperată deși cu o cantitate mică dintr-o a doua formă cristalină care a fost posibil o altă realizare hidratată cu un conținut mai ridicat de apă. Indexarea pentru o astfel de formă nu a fost posibilă din cauza cantității mici în care ea a fost prezentă. A treia difractogramă corespunde cu realizarea Is după o expunere de 4 zile la 25°C și 100% umiditate relativă, notată ca „10” în aceeași figură. Aceste condiții conduc la conversia realizării Is în realizarea 10, cu o mică contaminare a realizării inițiale Is, și solvatare cum s-a caracterizat în Tabelul 2. După deshidratare, ambele realizări Is și 10 au recristalizat la forma anhidră cu un punct de topire de 148°C.

Echilibrarea solventului la temperatura camerei a dat realizarea 1b din tolueen ca solvent de cristalizare, și realizarea 1f din p-xilen ca solvent de cristalizare.

Trei realizări solide suplimentare au fost identificate și denumite ca realizările 2, 3 și 7. Realizarea 2 a fost identificată din experimentul de echilibrare al solventului efectuat la temperatura camerei în 1,4-dioxan în timp ce realizarea 7 a fost găsită ca amestec cu realizarea Is în singurul experiment de echilibrare al solventului la 50°C din heptan. Câteva difractograme similare dar nu identice au fost identificate care au fost grupate ca realizările 3b, 3c, 3d și 3e care sunt membri izostructurali ai realizării 3. Membrii izostructurali ai realizării 3 au fost găsiți amestecați cu membri din realizarea 1. Amestecurile conținând membri din realizarea 3 s-au transformat în unele cazuri în realizarea 1a sau în amestecuri ale realizărilor 1a și 3e. Realizarea 7 a părut să fie stabilă fizic, dar realizarea 2 s-a convertit în realizarea 3e după expunerea la AAC timp de două zile.

Cristalizare evaporativă

Lichidul mamă salvat din experimentele de echilibrare ale solventului efectuate la RT a fost utilizat pentru experimente de cristalizare evaporativă lentă. Lichidul mamă a fost filtrat pentru a îndepărta orice materie particulară și lăsat să se evapore încet sub condiții ambientale. Solidele obținute au fost analizate prin HT-XRPD și din nou după expunerea la AAC timp de două zile.

Din cauza slabei solubilități a compusului din Ex. 1 în unii solvenți, nu s-a recuperat nici un solid când au fost utilizați astfel de solvenți. În experimentele unde solidele au precipitat, s-au recuperat un reziduu amorf sau membrii izostructurali ai realizărilor 1 sau 3. În timpul studiului de stabilitate, diferiți membri ai realizării 1 s-au convertit în realizarea 1a în timp ce moștră din realizarea 3 a părut a fi fizic stabilă. Amorftele solide în unele cazuri au rămas amorfte după studiul de stabilitate, s-au fluidizat sau au prezentat unele semne de cristalinitate.

Cristalizare prin răcire

Lichidul mamă din experimentele de echilibrare ale solventului efectuate la 50°C a fost filtrat la 50°C pentru a îndepărta orice materie particulară. Suspensiile la 50°C au fost filtrate utilizând filtre PTFE de 0,2 μm, și soluțiile au fost plasate la 5°C și îmbătrânite timp de 72 ore. Când solidele au precipitat în timpul îmbătrânirii, aceste solide au fost separate din lichid, uscate în condiții ambientale și sub vid, și analizate prin HT-XRPD. Lichidul mamă rămas a fost lăsat să se evapore încet și solidele rămase au fost analizate prin HT-XRPD. Mostrele în care nu a avut loc nici o precipitare au fost plasate sub vid și solidele uscate au fost analizate prin HT-XRPD. Toate solidele au fost apoi expuse la AAC (2 zile la 40°C/70% RH) și reanalizate prin HT-XRPD.

Solidele nu au precipitat după răcire în unele dintre soluții, în care cazuri soluțiile au fost evaporate în condiții ambientale. Din cauza solubilității scăzute a compusului din Ex. 1 în unii solvenți, nici un solid nu a fost obținut din unele soluții.

Precipitarea a avut loc de la patru solvenți (2-propanol, 2-butanonă, acetonitril, și metanol). Realizarea 6 a fost identificată după evaporarea unui singur experiment de cristalizare prin răcire la scară mL în 800 μL acetonitril, concentrație de 25 mg/mL. Realizarea 6 a părut a fi o formă solidă stabilă după 2 zile de AAC, și ea a apărut ca o realizare nesolvată.

Cristalizare prin răcire/evaporativă la scară μL

Experimentele de cristalizare prin răcire/evaporativă la scară μL au fost efectuate pe o placă cu 96 de godeuri, utilizând 12 solvenți puri și 12 amestecuri de solvenți și aplicând patru profile de temperatură. În fiecare godeu aproximativ 4 mg din realizarea Is au fost dozate solid. Ulterior, solvenții de cristalizare (80 μL) și amestecurile de solvenți au fost adăugate pentru a atinge o concentrație de 50 mg/mL, și placa, cu fiecare godeu individual etanșat, pentru a suferi ulterior unul dintre cele patru profile de temperatură. După terminarea profilelor de temperatură, solvenții au fost lăsați să se evapore la presiune ambientală scăzută (24 ore) și solidele rămase au fost analizate prin HT-XRPD înainte și după expunerea la AAC timp de 2 zile (40°C/70% RH).

Membrii realizărilor 1 și 3 au fost găsiți din cea mai mare parte a sistemelor de solvenți și profile de temperatură. Totuși, s-a observat o anumită tendință de formă solidă versus profilul de temperatură. Realizarea 1b a fost în principal identificată din profilul scurt de temperatură (îmbătrânire de 3 ore). Totuși, același sistem de solvenți cu timpi lungi de îmbătrânire a condus la identificarea din realizarea If, a membrilor din realizarea 3 sau amestecurilor de membri ai realizărilor 1 și 3. Realizarea 3c a fost obținută cu 1,4-dioxan ca solvent de cristalizare și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 1°C/h la o temperatură finală de 20°C, menținută timp de 48 ore; realizarea 3d a fost obținută cu tetrahidrofuran ca solvent de cristalizare și același profil de temperatură ca pentru realizarea 3c.

Realizarea 4 a fost identificată în experimentele efectuate în metanol/apă (50/50, v/v), THF și DCM/IPA (50/50, v/v) când s-au aplicat condiții scurte de îmbătrânire. Realizarea 4 a fost obținută prin tratarea realizării Is cu un amestec (50/50) de apă și metanol și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 20°C/h la o temperatură finală de 5°C, menținută timp de 3 ore, care au dat realizarea 4 împreună cu realizarea 1b. Realizarea 4 împreună cu realizarea 1b au fost de asemenea obținute prin tratarea Is cu un amestec (50/50) de apă și metanol și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 20°C/h la o temperatură finală de 20°C, menținută timp de 3 ore. Realizarea 4 nu a părut a fi fizic stabilă în condiții ambientale. Experimentele de cristalizare prin răcire au dat realizarea 1c din acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v) ca solvent de cristalizare și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 1°C/h la o temperatură finală de 5°C, menținută timp de 48 ore; realizarea 1d din acetonitril/cloroform (50/50, v/v) ca solvent de cristalizare și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 1°C/h la o temperatură finală de 5°C, menținută timp de 48 ore; și realizarea 1e din acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v) ca solvent de cristalizare și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 1°C/h la o temperatură finală de 20°C, menținută timp de 48 ore.

Realizarea 5 a fost identificată în experimentele efectuate în cloroform ca solvent de cristalizare și un profil de temperatură de 50°C ca temperatură inițială, menținută timp de 60 min, urmată de răcirea la o rată de 1°C/h la o temperatură finală de 20°C, menținută timp de 48 ore.

Conversii similare au fost observate în timpul studiului de stabilitate cum s-au observat anterior în celelalte metode de cristalizare. În cele mai multe cazuri toate formele solide s-au convertit la realizarea 1a sau la amestecuri care conțin realizarea 1a.

Cristalizare evaporativă din amestecuri solide

În cristalizarea evaporativă utilizând amestecuri de solvenți/anti-solvenți, sunt preparate soluții clare ale unui compus, din care mai întâi se evaporă solvențul (presiune ridicată a vaporilor) determinând compusul să precipite într-o oarecare măsură în formă de cristale. Aceste cristale acționează apoi ca seminte când antisolventul (presiune mai scăzută a vaporilor) este evaporat.

Compusul din Ex. 1 nu s-a dizolvat complet în fiecare din sistemele solvent. Din acest motiv, toate experimentele au inclus filtrarea înainte de evaporare.

Rezultatele analizei HT-XRPD au demonstrat că compusul din Ex. 1 a cristalizat în principal ca realizare 1s după evaporarea amestecurilor de solvenți. Acest lucru a fost observat pentru următoarele sisteme solvent/antisolvent: tetrahidrofuran/apă, acetonitril/apă, cloroform/etanol, metanol/acetat de etil, 2-butanonă/izopropanol, și heptan/acetona. Din două sisteme, acetona/cumenă și 1,4-dioxan/format de etil, au fost identificate realizările izostructurale 3b și 3e, care după AAC s-au convertit în diferite amestecuri ale realizărilor 1a și 3d, și 1s și respectiv 3e.

Cristalizare antisolvent

Soluțiile saturate ale compusului din Ex. 1 au fost preparate în solvenți puri. Adăugările antisolvent au fost efectuate în aditii directe și inverse. În aditia directă, antisolventul a fost adăugat în trei alicote la soluția compusului. Aditia inversă a fost efectuată prin adăugarea unui volum de soluție a compusului la un exces mare de antisolvent (20 mL).

După precipitare, solidele au fost separate de lichide, uscate în condiții ambientale și uscate sub vid (5 mbar) înainte de a fi analizate prin HT-XRPD. Experimentele în care nu a avut loc nici o precipitare după adăugarea antisolventului, au fost depozitate la 5°C timp de 48 ore pentru a induce precipitarea. Precipitatele solide au fost după aceea separate și analizate prin HT-XRPD. Când nu s-a obținut nici un solid, soluțiile au fost evaporate sub slabe și solidele reziduale au fost analizate prin HT-XRPD. Toate solidele au fost expuse la AAC (2 zile la 40°C/70%RH) și au fost reanalizate prin HT-XRPD.

Cristalizarea antisolvent directă a prezentat precipitare în toate cazurile. Toate solidele ar putea fi clasificate ca membri izostructurali (1s, 1b, 1j, 1f) din realizarea 1 sau din realizarea 3 (3b, 3d, 3f). După expunerea la AAC, toate mostrele solide s-au convertit la realizarea 1a, cu excepția uneia care s-a transformat într-un amestec al realizărilor 1a și 3e.

Experimentele de cristalizare antisolvent inversă efectuate în DMSO ca solvent au dat diferite forme solide depinzând de antisolventul utilizat. Cu diclorometan sau p-xilen s-au identificat membrii izostructurali ai realizării 1 (1s și 1b), în timp ce cu MTBE s-a obținut un reziduu amorf. Evaporarea a două soluții cu heptan și apă ca antisolvenți care nu au precipitat după adăugarea antisolventului, a condus la un ulei. Conversia la realizarea 1a a fost observată după AAC, și reziduurile amorfe au devenit fluide.

Experimente de filtrare la cald

Experimentele de cristalizare prin răcire cu filtrare la cald au fost efectuate din soluții suprasaturate ale compusului din Ex. 1 preparat la 50°C în diferite amestecuri de solvenți. Soluțiile filtrate la cald au suferit un profil de răcire de 48 ore. Fiolele din care solidele au precipitat după profilul de temperatură au fost centrifugate și solidele au fost separate din lichid și analizate prin HT-XRPD (după uscare sub vid). Dacă nici un solid nu a precipitat, soluțiile au fost evaporate sub vid și solidele analizate prin HT-XRPD. Toate solidele au fost expuse la AAC (2 zile la 40°C/70% RH) și reanalizate prin HT-XRPD. În jumătate din experimentele cu filtrare la cald precipitarea nu a avut loc și după evaporarea solvenților, nu s-au recuperat destule solide din cauza slabei solubilități a compusului din Ex. 1 în acele sisteme de solvenți. În trei experimente, a fost recuperat un reziduu amorf care după AAC a cristalizat la un amestec de membri din realizarea 1 (1s sau 1a) și 3 (3e) sau a devenit fluid. Realizarea 5 a fost identificată din experimentul în acetona/cloroform (50/50, v/v). Această realizare a părut să fie fizic instabilă deoarece conversia la realizarea 1a a fost observată după AAC.

Experimente de termociclare

Suspensii de aproximativ 6 mg ale realizării 1s au fost preparate în 10 solvenți la temperatura camerei. Suspensiile au fost cicluate între 5°C și 50°C. După terminarea termociclării, solidele au fost separate prin centrifugare și uscate sub condiții ambientale și sub vid (5 mbar) înainte fiind analizate prin HT-XRPD. Ulterior, toate solidele au fost expuse la AAC timp de două zile și analizate din nou prin HT-XRPD. Experimentele de termociclare promovează uzual formarea mai multor forme polimorfice stabile. Cu excepția experimentului efectuat în ciclohexanonă, toate fiolele au conținut solide după profilul termo. Soluția de ciclohexanonă a fost evaporată încet sub vid slab. Membrii realizărilor 1, 3 sau amestecurilor acestora au fost identificați în principal în solidele umede. După uscarea acestor solide, s-a observat conversia la realizarea 1s. Realizările 3b și 3e au fost obținute din termociclarea în 300 μ L a ciclohexanonei la o concentrație de 51 mg/mL (3b), și în 400 μ L de izobutanol la o concentrație de 37,3

mg/mL (3e). Realizarea 5 a fost obținută din termociclarea în 800 μ L a cloroformului la o concentrație de 18,6 mg/mL.

Figurile 3, 4 și 5 prezintă o suprapunere a tiparelor HT-XRPD pentru realizările listate în Tabelul 2 și de asemenea la care se face referire în verificările descrise mai sus.

Realizarea Is a fost recuperată din majoritatea experimentelor de cristalizare. Ea este un canal hidrat având un număr variabil de molecule de apă și/sau alți solvenți încorporați depinzând de condițiile ambientale. S-a observat conversia la realizarea 1a. Această formă a conținut puțin mai multă apă (1,3 molecule de apă). Toți membrii izostructurali ai realizării 1 s-au convertit la realizarea 1a după expunerea la 40°C și 75% RH timp de două zile. Deplasările dintr-unele maxime de difracție în tiparele XRPD pentru membrii din realizarea 1 ar putea fi atribuite diferitelor molecule de solvent sau apă care au fost încorporate în structura cristalină. Fig. 4 prezintă o suprapunere a tiparelor HT-XRPD pentru membrii din realizarea 1. Difractograma Is corespunde cu compusul din Ex. 1 ca materie primă în forma din realizarea Is. Difractograma 1a corespunde cu realizarea 1a care a fost obținută după expunerea la AAC a câtorva mostre din realizarea Is. Difractograma 1b corespunde cu realizarea 1b care a fost obținută din experimentul de echilibrare al solventului la RT în toluen. Difractograma 1c corespunde cu realizarea 1c care a fost obținută din experimentul de cristalizare prin răcire la scară μ L în acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v). Difractograma 1d corespunde cu realizarea 1d care a fost obținută din experimentul de cristalizare prin răcire la scară μ L în acetonitril/cloroform (50/50, v/v). Difractograma 1e corespunde cu realizarea 1e care a fost obținută din experimentul de cristalizare prin răcire la scară μ L în acetat de etil/1,4-dioxan (50/50, v/v). Difractograma 1f corespunde cu realizarea 1f care a fost obținută din experimentul de echilibrare al solventului la RT în p-xilen. Difractograma 1g corespunde cu realizarea 1g care a fost obținută din experimentul de echilibrare al solventului la 50°C în anisol. Difractograma 1h corespunde cu realizarea 1h obținută din experimentul de cristalizare prin răcire la scară μ L în p-xilen.

Difractogramele pentru membrii din realizarea 3 sunt prezentate în Fig. 5. Deplasările observate în diferitele tipare HT-XRPD sunt cel mai probabil atribuite diferitelor molecule de solvent care au fost încorporate în structura cristalină. Realizarea 3 a fost obținută prin încălzirea realizării 2 la 40°C la 70% RH timp de 4 zile. Realizările 3b până la 3e au fost forme solvate conținând o cantitate nonstoechiometrică de solvent care a variat depinzând de solventul încorporat în structura cristalină (0,3-0,7 molecule). Amestecurile conținând membri din realizarea 3 au fost instabile după expunerea la AAC și ele s-au transformat în unele cazuri în realizarea 1a sau în amestecuri ale realizărilor 1a și 3e. Conversia la realizarea 1a este atribuită schimbului de molecule de solvent cu moleculele de apă după expunerea la umiditate relativă ridicată, și recristalizarea la realizarea hidratată 1a.

Realizarea 9 a fost obținută prin încălzirea realizării 2 la o temperatură de aproximativ 200°C urmată de răcire la 25°C și de asemenea de DSC ciclic 25-200-25-300°C.

Realizarea 8 a fost obținută prin încălzirea realizării 5 la o temperatură de aproximativ 175°C.

Realizările acestei invenții includ compusul din Ex. 1 în cel puțin una dintre formele Is, 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 2, 3b, 3c, 3d, 3e, 5, 6, 7, 8, 9, și 10. Realizările acestei invenții includ compuși în conformitate cu această invenție în formă de co-cristale acceptabile farmaceutic.

Exemplele 1-12 sunt inhibitori ai JAK și au fost testate în teste enzimatic și celulare. Rezultatele testului enzimatic sunt prezentate în Tabelul 4 care este intitulat Rezultate ale testelor enzimatic de inhibare. Exemplele 1-12 au fost de asemenea testate în trei teste celulare: IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3), IFN α pSTAT4 (JAK1/TYK2) și GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2) cu rezultatele prezentate în Tabelul 5 intitulat Date de test pe bază de celule. Mai jos este descrierea de cum a fost efectuat testul enzimatic, incluzând materialele utilizate în test (sub titlul Materiale), cum testul a fost setat (sub titlul Protocol de testare), și metoda utilizată pentru a analiza datele (sub titlul Metodă de spectrometrie de masă cu randament ridicat (HTMS)).

Test de inhibare enzimatică

Materiale

Substratul (NH₂-KGEEEEYFELVKK-CO₂), peptida standard internă (NH₂-SWGAIETDKEYYTVKD-CO₂) și peptida produs (numai pentru curba standard) (NH₂-KGEEEEY-Pi-FELVKK-CO₂), au fost cumpărate de la AnaSpec (Fremont, CA, SUA). JAK1-JH1JH2 (574-1154 cu o etichetă His-GST și un situs de clivare tev C-terminal (ENLYFQ-G)), JAK3-JH1JH2 (512-1124 cu o etichetă GST și un situs de clivare tev C-terminal (ENLYFQ-G)), și Tyk2-JH1JH2 (8H_{tev}_580-1182-C936A-C1142A cu un situs de clivare tev C-terminal (ENLYFQ-G)) au fost purificați intern. JAK2-JH1JH2 (532-1132 cu o etichetă GST și situsul de clivare tev C-terminal (ENLYFQ-G)), au fost cumpărate de la Invitrogen. Apa de calitate LC/MS și acetonitrilul (ACN), au fost cumpărate de la HoneyWell, Burdick & Jackson (Muskegon, MI, SUA). Dimetilsulfoxidul 99,8% (DMSO) și acidul trifluoroacetic 99,5% (TFA) au fost cumpărate de la EMD Chemical (Gibbstown, NJ, SUA). Adenozin trifosfatul (ATP), acidul 4-morfolinpropansulfonic (MOPS), clorura de magneziu (MgCl₂), acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA), ditiotreititolul (DTT), acidul formic >95% (FA) și Tween-20 au fost cumpărate de la Sigma (St Louis, MO, SUA). Plăcile de polipropilenă cu 384 de godeuri, Cat#781280 au

fost cumpărate de la Greiner (Monroe, NC), coloană A C4 cu cartuş RapidFire™ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Experimentele HTMS au fost efectuate în mod ionizare pozitivă pe un instrument RapidFire 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), cuplat cu un sistem ABSiex QTrap 4000 cu o sursă de ionizare prin electropulverizare (RF-MS) (Concord, PE, Canada). Sistemul RapidFire a fost rulat cu pompe izocratice din seria 3 Agilent 1200 Agilent Technologies (Santa Clara, CA) și o pompă peristaltică model ISM832C de la Ismatec (Wertheim, Germania). Întregul sistem a fost operat utilizând software-ul RapidFire interfațat cu software-ul Analyst pentru spectrometrul de masă.

Protocol de testare

Seriile de dozare în 11 puncte au fost făcute pentru fiecare compus diluând serial 1:3 sau 1:4 în DMSO, cu punctul 12 fiind un control DMSO. Din plăcile de diluție serială, mostra a fost transferată la o placă de testare cu 384 godeuri (#781280, Greiner, Monroe, NC) utilizând Labcyte Echo (Sunnyvale, CA), sau Biosero ATS (San Diego, CA). Compușii au fost testați în duplicat. Coloana 12 a fost utilizată pentru controalele pozitive, și coloana 24 a conținut controale negative fără enzimă adăugată. Un compus din colecția noastră internă, cu activitate inhibitoare pentru izoformele JAK, a fost utilizat ca compus de referință. Concentrația finală de DMSO a fost $\leq 0,25\%$ într-o reacție de 20 μL . Condițiile de testare pentru fiecare dintre proteine sunt rezumate în Tabelul 3. Reacția enzimei a fost inițiată prin adăugarea a 10 μL de enzimă și amestec ATP până la 10 μL de soluție substrat preparată în tampon de reacție (50 mM MOPS pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,002% Tween-20). Enzima Tyk2 a fost preincubată cu 2mM ATP timp de 30 min înainte de începerea reacției. Imediat după adăugarea enzimei la amestecul de reacție, placa a fost centrifugată la 1000 rpm timp de 1 minut și incubată la 25°C timp de 45 minute pentru JAK3 și 90 minute pentru JAK1, JAK2 și Tyk2. Reacția a fost stinsă prin adăugarea de 20 μL de 0,5 % TFA conținând 0,15 μM de peptidă internă standard utilizând dozatorul reactiv Multidrop Combi (Thermo Scientific, Waltham, MA). Câteva godeuri din coloana 24 au fost de obicei utilizate pentru curba standard a produsului. După stingere, placa de test a fost centrifugată la 3000 rpm timp de 3 minute și etanșată cu folie penetrabilă de aluminiu (Cat# 06644-001, Agilent) utilizând un PlateLoc (Agilent Tehnologii, Santa Clara, CA). Plăcile au fost apoi transferate pe RapidFire pentru analiza MS. Inhibarea compusului a fost evaluată printr-o scădere a nivelurilor fosforilate ale produsului în godeurile cu mostră în comparație cu reacția enzimei neinhibate. Condițiile de testare pentru testul de mai sus sunt prezentate în Tabelul 3 și rezultatele din Ex. 1 - 12 așa cum s-au testat în aceste teste sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabelul 3. Condiții de testare pentru testele enzimatică ale familiei JAK*

Enzimă	[enzimă], nM	[ATP], μM	[Substrat], μM	[IS], nM
JAK1-JH1JH2	8,0	12,5	200	100
JAK2-JH1JH2	7,0 sau 3,6	30	40	100
JAK3-JH1JH2	2,0	150	40	100
Tyk2-JH1JH2	25 sau 14,7	50	200	100
*Tampon de reacție: 50 mM MOPS, pH 7,5 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,002% Tween-20; „IF” înseamnă peptidă standard internă; „Substrat” înseamnă peptidă.				

Metodă de spectrometrie de masă cu randament ridicat (HTMS)

Analiza mostrei pe RapidFire a fost efectuată utilizând o fază mobilă A1 constând din apă/TFA/FA (100:0,01:0,1, v/v/v), o fază mobilă B1 constând din ACN/apă/TFA/FA (80:20:0,01:0,1, v/v/v). S-au utilizat următorii parametri de rulare: stare 1 (aspirare), 250 ms; stare 2 (încărcare/spălare), 3000 ms; stare 3 (eluate), 4000 ms; stare 4 (reechilibrare), 1000 ms cu un debit de 1,25 mL/min. Mostrele au fost aspirate direct din placa de testare cu 384 de godeuri și livrate pe un cartuş de extragere C4 I fazei solide cu micoscară RF-MS (Tip A). Componentele nedorite cum ar fi sarea, cofactorii, detergenții și proteinele mari au fost spălate și analiții reținuți (substrat, produs și IS) au fost coeluati direct pe sistemul ABSiex Qtrap 4000. Cuantificarea peptidei (substrat), fosfo-peptidei (produs) și peptidei standard interne (IS) a fost efectuată prin MRM utilizând tranzițiile 562→136,0, 589,2→215,7 și 953,2→158,8 (sau 974,2→158,8) respectiv.

Tabelul 4. Rezulte ale testelor enzimatică de inhibare

Compus de testat	JAK1_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)
A	<0,2	<0,2	12,4	0,9

Compus testat	de	JAK1_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)
B		<0,2	<0,2	13,4	<0,2
C		<0,2	0,6	49,7	0,2
Ex. 1		0,4	8,6	92,2	7,4
Ex. 2		0,2	1,0	33,9	1,5
Ex. 3		0,2	6,2	82,8	11,6
Ex. 4		0,1	6,6	96,2	2,2
Ex. 5		0,3	2,1	23,1	4,1
Ex. 6		0,1	1,4	28,2	1,1
Ex. 7		0,2	5,6	98,4	4,8
Ex. 8		0,4	7,0	75,6	6,6
Ex. 9		0,2	6,6	79,9	4,7
Ex. 10		1,0	6,5	87,5	9,0
Ex. 11		0,4	1,6	30,3	1,5
Ex. 12		0,9	9,4	101,3	8,7

Teste celulare

Test celular IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3)

- 5 Testul AlfaLISA (pe baza Alpha Technology de la PerkinElmer) a fost efectuat prin placarea mai întâi a PBMC-urilor proaspăt dezghețate (Biological Specialty Corporation) în plăci cu 384 de godeuri la 30.000 celule pe 4 μ L pe godeu în HBSS (soluție salină echilibrată Hank) conținând 0,1% IgG fără (imunoglobulină G), BSA fără protează (albumină din ser bovin) (Jackson ImmunoResearch Cat. nr. 001-000-161). Celulele au fost apoi tratate cu 2 μ L/godeu de compuși diluați în DMSO la concentrații
- 10 titrate jumătate-log, cu cea mai mare concentrație de testare de 10 μ M și 0,5% concentrație DMSO finală, timp de treizeci de minute la 37°C. Apoi, celulele au fost stimulate cu 2 μ L/godeu de IL-2 (R&D Systems Cat. nr. 202-IL-050) la 5 ng/mL timp de treizeci de minute la 37°C. Reacțiile celulare au fost oprite prin adăugarea de 2 μ L/godeu de tampon de lizare (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) urmat de o
- 15 incubare de cinci minute la temperatura camerei. S-au adăugat 5 μ L/godeu de amestec acceptor (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric timp de o oră la temperatura camerei. Apoi, s-au adăugat 5 μ L/godeu de amestec donator (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric peste noapte la temperatura camerei. În final, plăcile au fost citite pe un PerkinElmer EnVision pentru detecția semnalului de fluorescență rezolvat în timp. Procentajul de inhibare pSTAT5 dependent de IL-2 a fost determinat la concentrațiile compusului
- 20 de test; și pentru fiecare compus, a fost generată o curbă de dozare și s-a calculat IC₅₀. Compusul IC₅₀ a fost calculat prin regresie neliniară, analiza sigmoidală de răspuns la doză a curbei de titrare a diluției jumătate-log a concentrației compusului vs. semnalul Alfa. Acronimul „Alfa” înseamnă test omogen de proximitate luminiscentă amplificată; semnalul Alfa este un semnal luminescent/fluorescent.

Test celular IFN α pSTAT4 (JAK1/TYK2)

- 25 Testul AlfaLISA (pe baza Alpha Technology de la PerkinElmer) a fost efectuat prin placarea mai întâi a PBMC-urilor proaspăt dezghețate (Biological Specialty Corporation) în plăci cu 384 de godeuri la 100.000 celule pe 6 μ L pe godeu în DMEM (mediu Eagle modificat Dulbecco) conținând 10% FBS (ser fetal bovin) și 1.000 I.U./mL penicilină și 1.000 μ g/mL streptomicină. Celulele au fost apoi
- 30 tratate cu 2 μ L/godeu de compuși diluați în DMSO la concentrații titrate jumătate-log, cu cea mai mare concentrație de testare de 10 μ M și 0,5% concentrație DMSO finală, timp de treizeci de minute la 37°C. Apoi, celulele au fost stimulate cu 2 μ L/godeu de IFN α (PBL Test Science Cat. nr. 11101-2) la 4 ng/mL timp de treizeci de minute la 37°C. Reacțiile celulare au fost oprite prin adăugarea a 2 μ L/godeu de tampon de lizare (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST4-A10K) urmat de o incubare de cinci minute la temperatura camerei. S-au adăugat 4 μ L/godeu de amestec acceptor (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST4-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric timp de o oră la temperatura camerei. Apoi, s-au adăugat 4
- 35 μ L/godeu de amestec donator (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST4-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric peste noapte la temperatura camerei. În final, plăcile au fost citite pe un PerkinElmer EnVision pentru detecția semnalului de fluorescență rezolvat în timp. Procentajul de inhibare pSTAT4 dependent

de IFN α a fost determinat la concentrațiile compusului de test; și pentru fiecare compus, a fost generată o curbă de dozare și s-a calculat IC₅₀. Compusul IC₅₀ a fost calculat prin regresie neliniară, analiza sigmoidală a răspunsului la doză a curbei de titrare a diluției jumătate-log a concentrației compusului vs. semnalul Alfa. Termenul „Alfa” este definit în descrierea testului celular imediat precedentă.

5 Test celular GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2)

Testul AlfaLISA (pe baza Alpha Technology de la PerkinElmer) a fost efectuat prin placarea mai întâi a PBMC-urilor proaspăt dezghețate (Biological Specialty Corporation) în plăci cu 384 de godeuri la 30.000 celule pe 4 μ L pe godeu în HBSS conținând 0,1% BSA fără IgG, fără protează (Jackson ImmunoResearch Cat. nr. 001-000-161). Celulele au fost apoi tratate cu 2 μ L/godeu al compușilor diluați în DMSO la concentrații titrate jumătate-log, cu cea mai mare concentrație de testare de 10 μ M și 0,5% concentrație DMSO finală, timp de treizeci de minute la 37°C. Apoi, celulele au fost stimulate cu 2 μ L/godeu de GM-CSF (R&D Systems Cat. nr. 215-GM-050) la 11 pg/mL timp de cincisprezece minute la 37°C. Reacțiile celulare au fost oprite prin adăugarea a 2 μ L/godeu de tampon de lizare (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) urmat de o incubare de cinci minute la temperatura camerei. S-au adăugat 5 μ L/godeu de amestec acceptor (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric timp de o oră la temperatura camerei. Apoi, s-au adăugat 5 μ L/godeu de amestec donator (PerkinElmer Cat. nr. ALSU-PST5-A10K) la celule și s-au incubat în întuneric peste noapte la temperatura camerei. În final, plăcile au fost citite pe un PerkinElmer EnVision pentru detecția semnalului fluorescent rezolvat în timp. Procentajul de inhibare pSTAT5 dependentă de GM-CSF a fost determinat la concentrațiile compusului de test; și pentru fiecare compus, a fost generată o curbă de dozare și s-a calculat IC₅₀. Compusul IC₅₀ a fost calculat prin regresie neliniară, analiza sigmoidală a răspunsului la doză a curbei de titrare a diluției jumătate-log a concentrației compusului vs. semnalul Alfa. Termenul „Alfa” este definit în descrierea testului celular IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3).

Tabelul 5. Date de test pe bază de celule

Compus de testat	IL-2 (JAK1/JAK3) IC ₅₀ (nM)	pSTAT5 (JAK1/TYK2) IC ₅₀ (nM)	pSTAT4 (JAK2/JAK2) IC ₅₀ (nM)	GM-CSF (JAK2/JAK2) IC ₅₀ (nM)
Ex. 1	21,6	59,5		83,9
Ex. 2	9,0	20,8		61,0
Ex. 3	6,4	10,1		21,9
Ex. 4	35,5	64,7		119,4
Ex. 5	6,4	38,1		28,9
Ex. 6	6,7	39,4		25,1
Ex. 7	9,7	38,5		67,3
Ex. 8	20,6	42,8		33,8
Ex. 9	11,2	35,9		26,9
Ex. 10	16,8	40,4		44,6
Ex. 11	49,1	96,5		201,5
Ex. 12	13,9	81,4		75,4

Exemplele 1-12 au fost testate în teste de solubilitate și de permeabilitate. Rezultatele testului de solubilitate sunt prezentate în Tabelul 6 care este intitulat Date ale testului de solubilitate și rezultatele testului de permeabilitate sunt prezentate în Tabelul 7 intitulat Date de permeabilitate MDCK-MDR1. Aceste teste de solubilitate și de permeabilitate sunt descrise mai jos sub titlurile Teste de solubilitate și respectiv Teste de permeabilitate.

30 Teste de solubilitate

Măsurătorile de solubilitate au fost efectuate în următorul mediu de solubilitate: simulat gastric (34,2 mM de clorură de sodiu și 100 mM de acid clorhidric) sau fluide intestinale simulate (stare de înfometare [pH 6,5]: 3 mM de taurocolat de sodiu, 0,75 mM de lecitină, 28,4 mM de fosfat de sodiu monobazic, 8,7 mM de hidroxid de sodiu, și 105,9 mM de clorură de sodiu). Compușii testați au fost dizolvați în DMSO la o concentrație de 10 mM. Compușii testați au fost dispensați (20 μ L) în plăci Nunc 1-mL-96-Deep-Well-PP, și DMSO a fost evaporat prin suflare de azot dintr-un TurboVap 96 timp de 6 ore sau până când s-a produs un reziduu uscat. Apoi, 400 μ L de mediu de solubilitate a fost adăugat la godeurile conținând solidul uscat. Un capac pentru godeuri pre-deschis a fost plasat în siguranță peste blocul plăcii cu godeuri, și mostrele au fost agitate viguros timp de 2-5 zile la temperatura ambiantă. După perioada de incubare, mostrele au fost filtrate printr-o placă de filtrare AcroPrep 1-mL-96 într-o

noă placă 2-mL-96-Deep-Well-PP, și supernatanții au fost cuantificați prin UV-HPLC utilizând o calibrare în 3-puncte care variază de la 0,004-0,55 mM. Solubilitatea pentru fiecare compus a fost calculată din ecuația următoare:

$$\text{Solubilitate} = \frac{\text{Mostra zonei vârfului}}{\text{Factor de răspuns mediu din 3 standarde}}$$

- 5 Valorile de solubilitate au fost în intervalul de 4 - 400 μM . Valorile din afara acestui interval au fost raportate ca fie < 4 μM sau fie > 400 μM . Solubilitățile sunt raportate atâta timp cât compusul sub studiu a fost suficient de stabil pentru a completa determinarea de solubilitate corespunzătoare.

Tabelul 6. Date ale testului de solubilitate

Compus de testat	Solubilitate SGF (μM)	Solubilitate SIF (μM)
A	>400	>400
B	>400	75
C	>400	>400
Ex. 1	>400	387
Ex. 2	>400	>400
Ex. 3	>400	>400
Ex. 4	>400	>400
Ex. 5	>400	198
Ex. 6	>400	>400
Ex. 7	>400	81
Ex. 8	>400	>400
Ex. 9	>400	>400
Ex. 10	>400	359
Ex. 11	>400	>400
Ex. 12	>400	>400

10 Test de permeabilitate

Măsurătorile de permeabilitate au fost efectuate în conformitate cu protocolul Cyprotex utilizând linia celulară MDCK-MDR1 obținută de la NIH (Rockville, MD, SUA). Celulele dintre numerele de trecere 6 - 30 au fost înșămânțate pe o placă Multiscreen™ (Millipore) la o densitate celulară de $3,4 \times 10^5$ celule/cm² și cultivate timp de trei zile înainte de a se efectua studiile de permeabilitate. Celulele din acest test formează o foaie coezivă a unui singur strat celular care umple aria suprafeței vasului de cultură, cunoscut de asemenea ca monostrat confluent, și în ziua patru compusul de testat a fost adăugat la partea apicală a membranei și transportul compusului de-a lungul monostratului a fost monitorizată pe o perioadă de timp de 60 min.

Într-un mod simplu și de bază al introducerii termenilor „A” și „B” care sunt adesea utilizați în aceste teste, partea apicală („A”) sau compartimentul unei entități este partea unei astfel de entitate care este expusă la lumen sau mediul exterior, în timp ce partea bazolaterală („B”) sau compartimentul este partea sau compartimentul unei astfel de entități care este expusă de obicei mediului intern, cuprinzând partea opusă. De exemplu, când o astfel de entitate este ilustrativ o celulă epitelială intestinală, partea apicală a unei astfel de celule intestinale ar fi partea celulei expusă la lumenul intestinal, în timp ce partea bazolaterală ar fi partea care este expusă la sânge.

Compușii testați au fost dizolvați în DMSO la o concentrație de 10 mM. Soluțiile de dozare au fost preparate prin diluarea compusului de testat cu tampon de testare (soluție salină echilibrată Hanks), pH 7,4, la o concentrație finală de 5 μM . Pentru evaluarea permeabilității apicale la bazolaterală („A-B”), tamponul a fost îndepărtat din compartimentul apical și înlocuit cu soluția de dozare a compusului de testat cu sau fără glicoproteina de permeabilitate („PgP”, „P-gP”, „Pgp” sau „P-gp”) inhibitor elacridar (2 μM). Pentru evaluarea permeabilității bazolaterală la apicală („B-A”), tamponul a fost îndepărtat de placa însoțitoare și înlocuit cu soluție de dozare a compusului de testat. Incubările au fost efectuate în duplicat la 37°C într-o atmosferă de 5% CO₂ cu o umiditate relativă de 95%. Fiecare test a inclus markerii de referință propranolol (permeabilitate ridicată) și prazosin (substrat PgP). După incubare timp de 60 minute, mostrele apicală și bazolaterală au fost diluate și compușii testați cuantificați prin LC/MS/MS

utilizând o calibrare în 8 puncte variind de la 0,0039 până la 3 μM cu diluția adecvată a mostrelor (factorul de diluție al receptorului = 1; donator și factor de diluție $C_0 = 10$). Coeficientul de permeabilitate (P_{app}) pentru fiecare compus a fost calculat din următoarea ecuație: $P_{\text{app}} = (dQ/dt) / (C_0 \times S)$, unde dQ/dt este rata de penetrare a medicamentului în celule, C_0 este concentrația compartimentului donator la momentul zero, și S este aria monostratului celular.

Recuperarea procentuală a fost măsurată pentru toate condițiile de incubare. Aceste măsurători nu au dezvăluit legarea inacceptabilă a compusului/plăcii sau acumularea compusului în monostratul celular.

A doua și a treia coloană din Tabelul 7 prezintă valorile $P_{\text{app(A-B)}}$ pentru transportul compusului apical-la-bazolateral fără (a doua coloană) și cu un inhibitor P-gp (a treia coloană, notată cu $P_{\text{app(A-B)}}^{\text{e}}$) care a fost elacridarul. $P_{\text{app(A-B)}}$ dă o indicație a măsurii penetrării prin celule în acest test, care este avută în vedere pentru a modela transportul transcelular de-a lungul celulelor care exprimă Pgp, cum ar fi celulele tractului gastrointestinal care exprimă Pgp. Valorile $P_{\text{app(A-B)}}^{\text{e}}$ ($P_{\text{app(A-B)}}$ în prezența inhibitorului P-gp) date în coloana 3 sunt determinate pentru a confirma rolul P-gp în efluxul compusului. A patra coloană din Tabelul 7 prezintă valorile $P_{\text{app(B-A)}}$ pentru transportul compusului bazolateral-la-apical. Rapoartele de eflux ale compusului de testat sunt date în a cincea coloană a Tabelului 7 ca $P_{\text{app(B-A)}} / P_{\text{app(A-B)}}$ prin utilizarea valorilor corespunzătoare ale coeficientului de permeabilitate din a patra și a doua coloană din același tabel. Rapoartele de eflux (a cincea coloană, Tabelul 7) sunt consistent mai mari decât 2 pentru compușii (A) - (C) și de asemenea pentru compușii din Ex. 1-12, care indică faptul că efluxul compusului are loc pentru toți astfel de compuși.

Valorile $P_{\text{app(A-B)}}$ din coloana 2 sunt în general scăzute și comparabile pentru compușii de referință (A) - (C) și de asemenea pentru compușii din Ex. 1-12. Aceste valori scăzute au indicat permeabilitate redusă pentru toți astfel de compuși, care este din cauza efectelor P-gp deoarece toți astfel de compuși sunt substraturi P-gp cum s-a indicat prin valorile date în coloana 5 care sunt toate mai mari decât 2. Pentru a fi caracterizate ca având permeabilitate redusă, valorile date în a treia și a patra coloană pentru $P_{\text{app(A-B)}}^{\text{e}}$ și respectiv $P_{\text{app(B-A)}}$, ar trebui să fie scăzute. Totuși, aceste date arată că valorile $P_{\text{app(B-A)}}$ pentru compușii (A) - (C) sunt mai mari decât valorile corespunzătoare ale compușilor din Ex. 1-12.

Integritatea fiecărui monostrat a fost monitorizată prin examinarea penetrării galbenului luciferic al analizei fluorimetrice. Această examinare a dezvăluit că celulele din acest test au menținut un monostrat confluent satisfăcător.

Tabelul 7. Date de permeabilitate MDCK-MDR1

Compus de testat**	$P_{\text{app(A-B)}}$ MDCK-MDR1 (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μM)	$P_{\text{app(A-B)}}^{\text{e}}$ MDCK-MDR1 (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μM)	$P_{\text{app(B-A)}}$ MDCK-MDR1 (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μM)	$P_{\text{app(B-A)}} / P_{\text{app(A-B)}}$
A	1,3	22	55,3	43
B	0,4	1,7	23,5	59
C	0,5	2,5	23,1	46
Ex. 1	<0,5, 0,4	<0,5, 1,1	0,9, 1,1	>1,9, 3,3
Ex. 2*	1,1	1,6	4,8	4,4
Ex. 3	<0,4, <0,5	2,3, 1,6	17, 16	>41, >33
Ex. 4	0,1	0,5	1,3	8,7
Ex. 5	<0,4, <0,5	0,7, 0,5	1,8, 2,1	> 4,8, >4,5
Ex. 6	<0,3, <0,3	0,9, 1,1	2,5, 2,6	> 8,4, >8,7
Ex. 7	<0,4	1,2	3,6	>9
Ex. 8	0,1	0,5	1,7	11,5
Ex. 9	<0,4	0,6	1,8	> 4,2
Ex. 10	<0,4	1,1	7,1	> 16,9
Ex. 11	<0,4	0,8	1,1	> 2,9
Ex. 12	<0,5	0,6	1,1	> 2,2

*Concentrația inițială a fost măsurată ca fiind $>7 \mu\text{M}$ pentru condițiile A la B, A la B (cu elacridar), și B la A.

**În afară de cazul când s-a indicat altfel, compușii (A) - (C) și Ex. 1 - 12 au fost testați la o concentrație de 5 μM . Pentru datele prezentate în celule cu două puncte date, compușii au fost testați de

Compus de testat**	P _{app} (A-B) MDCK-MDR1 (10 ⁻⁶ cm/sec) @ 5 (μM)	P _{app} ^e (A-B) MDCK-MDR1 (10 ⁻⁶ cm/sec) @ 5 (μM)	P _{app} (B-A) MDCK-MDR1 (10 ⁻⁶ cm/sec) @ 5 (μM)	P _{app} (B-A) / P _{app} (A-B)
două ori.				

Studii *in vivo*

Dozare orală -Protocol 1

La trei șoareci femele C57BL/6 neînfometate li s-a administrat oral compusul de testat la o doză de 25 mg/kg p.o. ca soluție în 20% hidroxipropil-beta-ciclodextrină (HPβCD) la un volum de dozare de 5 mL/kg. Probele de sânge au fost colectate la 0,5, 2, și 4 ore după doză prin sângerare retro-orbitală sau puncție venoasă a venei metatarsale dorsale. Probele de sânge au fost colectate în tuburi conținând anticoagulant (Heparină-Na) și plasate pe gheață umedă. Frațiunea de plasmă a fost separată prin centrifugare și congelată la -20°C timp de până la 4 ore, și la -80°C după 4 ore în afară de cazul când a fost analizată la scurt timp după colectarea mostrei. Mostrele de colon au fost colectate la 4 ore post doză. De la începutul cecumului, o mostră de 4 - 6 cm a colonului a fost disecată, tăiată deschis pe axa longitudinală, și conținuturile solide îndepărtate prin spălare cu 2 mL de soluție salină. Colonul a fost mai departe spălat punându-l în 5 mL de soluție salină și agitat timp de 5 secunde. Mostra de colon a fost apoi uscată prin batere, cântărită, și omogenizată ca 1 parte țesut (g) la 4 părți apă de calitate HPLC (mL). Concentrațiile de compus în plasmă și omogenatul de colon au fost determinate utilizând o metodă calificată de cromatografie de lichide-spectrometrie de masă cu triplu cvadripol (LC-MS/MS). Acest protocol a fost utilizat pentru a evalua următorii compuși testați: compușii (B) și (C) și Exemplele 6 și 11.

Dozare orală -Protocol 2

La trei șoareci femele C57BL/6 neînfometate li s-a administrat oral compusul de testat la o doză de 25 mg/kg p.o. ca soluție în 20% HPβCD la un volum de dozare de 5 mL/kg. Probele de sânge au fost colectate la 0,5, 2, și 4 ore după dozare prin sângerare retro-orbitală sau din vena metatarsală dorsală. Probele de sânge au fost colectate în tuburi conținând anticoagulant (Heparină-Na) și plasate pe gheață umedă. Frațiunea de plasmă a fost separată prin centrifugare și congelată la -20°C pentru până la 4 ore, și la -80°C după 4 ore în afară de cazul când a fost analizată la scurt timp după colectarea mostrei. Mostrele de colon au fost colectate la 4 ore post doză. De la 2 cm sub cecum, o mostră de 4 cm a colonului a fost disecată, tăiată deschis pe axa longitudinală, și conținuturile solide îndepărtate prin spălare cu 2 mL de soluție salină. Colonul a fost mai departe spălat punându-l în 5 mL de soluție salină și agitat timp de 5 secunde. Mostra de colon a fost apoi uscată prin batere, cântărită, și omogenizată ca 1 parte țesut (g) la 4 părți apă de calitate HPLC (mL). Concentrațiile de compus în plasmă și omogenatul de colon au fost determinate utilizând o metodă calificată de cromatografie de lichide-spectrometrie de masă cu triplu cvadripol (LC-MS/MS) metodă. Acest protocol a fost utilizat pentru a evalua următorii compuși testați: compusul (A) și Exemplele 1-5, 7-10, și 12.

Dozare IC -Protocol 3

Grupul cu doză intracolonică (IC): După anestezia cu izofluran prin inhalare, la trei șoareci femele C57BL/6 neînfometate li s-a administrat compusul intracolonic printr-o mică incizie în peretele abdominal utilizând o seringă și un ac la o doză de 5 mg/kg ca soluție în 20% HPβCD la un volum de dozare de 1 mL/kg. Probele de sânge au fost colectate la 0,5, 2, și 4 ore post doză prin sângerare retro-orbitală. Mostrele de sânge au fost colectate în tuburi conținând anticoagulant (Heparină-Na) și plasate pe gheață umedă. Frațiunea de plasmă a fost separată prin centrifugare și congelată la -20°C timp de până la 4 ore, și la -80°C după 4 ore în afară de cazul când a fost analizată la scurt timp după colectarea mostrei. Mostrele de colon au fost colectate la 4 ore post doză. De la 2 cm sub cecum, o mostră de 4 cm a colonului a fost disecată, tăiată deschis pe axa longitudinală, și conținuturile solide îndepărtate prin spălare cu 2 mL de soluție salină. Colonul a fost mai departe spălat punându-l în 5 mL de soluție salină și agitat timp de 5 secunde. Mostra de colon a fost apoi uscată prin batere, cântărită, și omogenizată ca 1 parte țesut (g) la 4 părți apă de calitate HPLC (mL). Concentrațiile de compus în plasmă și omogenatul de colon au fost determinate utilizând o metodă calificată de cromatografie de lichide-spectrometrie de masă cu triplu cvadripol (LC-MS/MS). Acest protocol a fost utilizat pentru a evalua dozarea IC a următorilor compuși testați: Exemplele 1, 3, și 4.

Compușii din Ex. 1 - 12 sunt caracterizați în plus prin proprietățile fizico-chimice date în Tabelul 8. Valorile cLogP și tPSA au fost calculate prin utilizarea ChemBioDraw Ultra 14.0, unde P este coeficientul de partiție *n*-octanol - apă. Aria suprafeței polare totale (tPSA) este calculată ca suma

suprafețelor pe toți atomii polari, în primul rând oxigen și azot, incluzând de asemenea hidrogenii lor atașați.

Tabelul 8. Unele proprietăți fizico-chimice ale compuşilor din Ex. 1 – 12

5

Compus de testat	cLog P	tPSA	# donatori de legături H	# acceptori de legături H	# legături rotative
Ex. 1	0,94	113,11	3	5	6
Ex. 2	2,31	88,17	2	4	3
Ex. 3	1,58	92,88	2	4	6
Ex. 4	0,54	116,67	2	5	6
Ex. 5	0,24	102,11	2	5	5
Ex. 6	0,86	102,11	2	5	6
Ex. 7	1,25	116,67	2	5	6
Ex. 8	1,13	113,11	3	5	6
Ex. 9	1,14	108,48	2	5	5
Ex. 10	1,35	116,67	2	5	6
Ex. 11	1,50	117,27	3	5	5
Ex. 12	0,57	113,11	3	5	6

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- MARK ZAK ET AL: "Identification of C -2 Hydroxyethyl Imidazopyrrolopyridines as Potent JAK1 Inhibitors with Favorable Physicochemical Properties and High Selectivity over JAK2", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 56, no. 11, 31 May 2013 (2013-05-31), pages 4764-4785, XP055462006, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm4004895
- WO-A1-2011/086053
- WO-A1-2013/007765

(57) Revendicări:

1. Un compus selectat din grupul constând din
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetamidă;
 N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo [2,3-b]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(tetrahidro-2H-piran-4-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-((tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)acetamidă;
 N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-d]pirolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(1-metil-1H-pirazol-4-il)acetamidă;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

2. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetamidă;
N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexyl)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

3. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetamidă;
N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

4. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora,
 în care opțional compusul menționat este:
 (a) 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamido; sau
 (b) 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril; sau
 (c) 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă.

5. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetamidă;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetamidă;
N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

6. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetamidă;
N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2*H*-piran-4-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

7. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetrahidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetamidă;
N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

8. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

9. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;
 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)ciclohexil)acetonitril;
 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și
 săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora,
 în care opțional compusul menționat este selectat din:
 (a) grupul constând din

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril; și

săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora; sau din

(b) grupul constând din

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și

săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora; sau din

(c) grupul constând din

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și

săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora.

10. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetamidă;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo [2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetrahidro-2H-piran-4-il)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)acetamidă;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclobutil)metil)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1H-pirazol-4-il)acetamidă;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2,2,1]heptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1H-pirazol-3-il)acetamidă;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și

co-cristale acceptabile farmaceutic ale acestora.

11. Un compus cum s-a revendicat în revendicarea 10 selectat din grupul constând din

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil) acetonitril;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și

co-cristale acceptabile farmaceutic ale acestora.

12. O compoziție farmaceutică cuprinzând o cantitate eficientă terapeutic din cel puțin un compus cum s-a revendicat în revendicarea 1.

13. O compoziție farmaceutică cum s-a revendicat în revendicarea 12, în care compusul menționat este selectat din grupul constând din

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil)acetonitril;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă; și

săruri acceptabile farmaceutic, și combinații ale acestora,

în care opțional compusul menționat este:

(a) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-hidroxi-2-metilpropil)acetamidă; sau

(b) 2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)ciclohexil)acetonitril; sau

(c) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)ciclohexil)-1,6-dihidroimidazo[4,5-*d*]pirolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-hidroxiciclopropil)metil)acetamidă.

FIG. 1

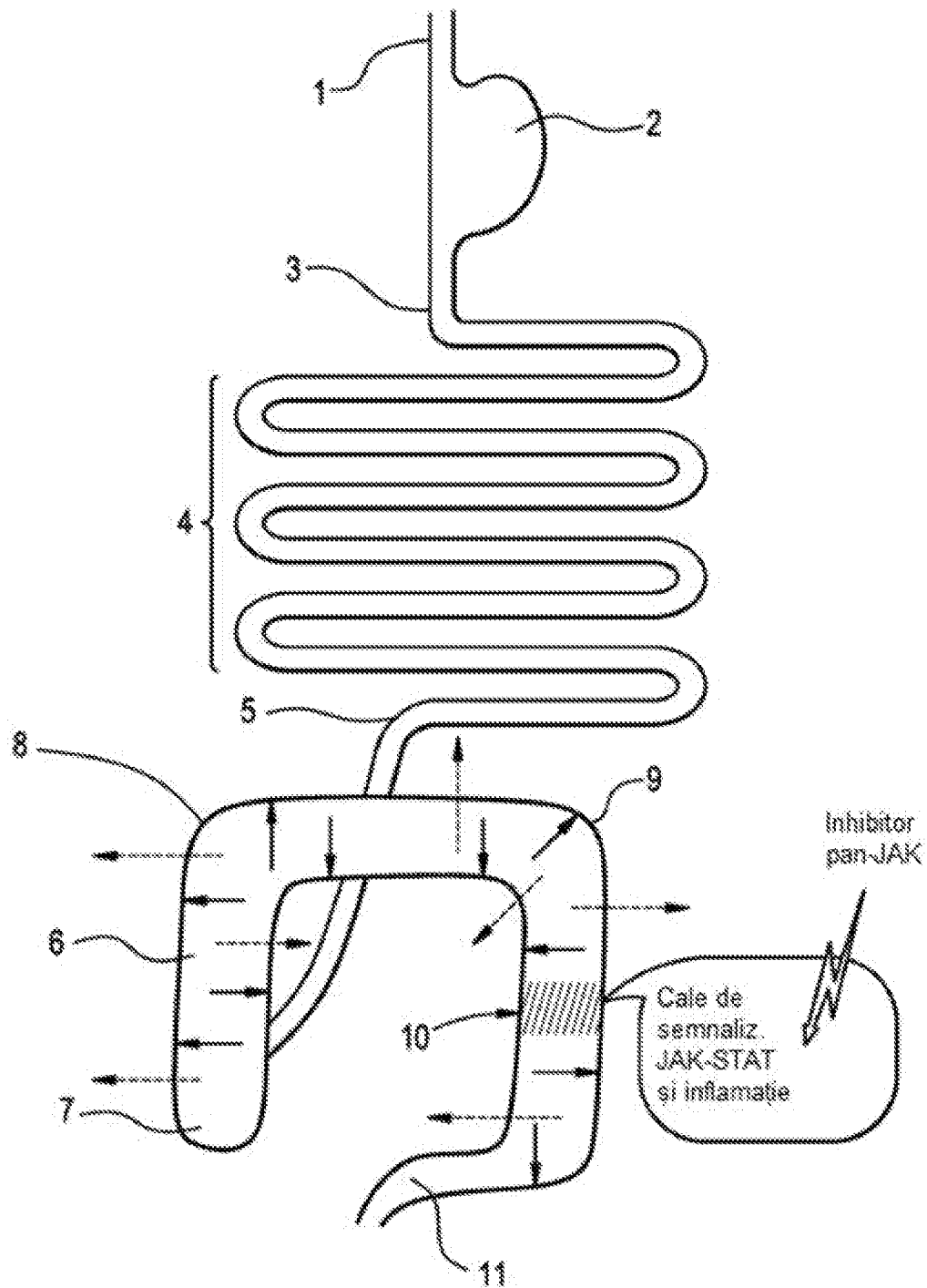


FIG. 2

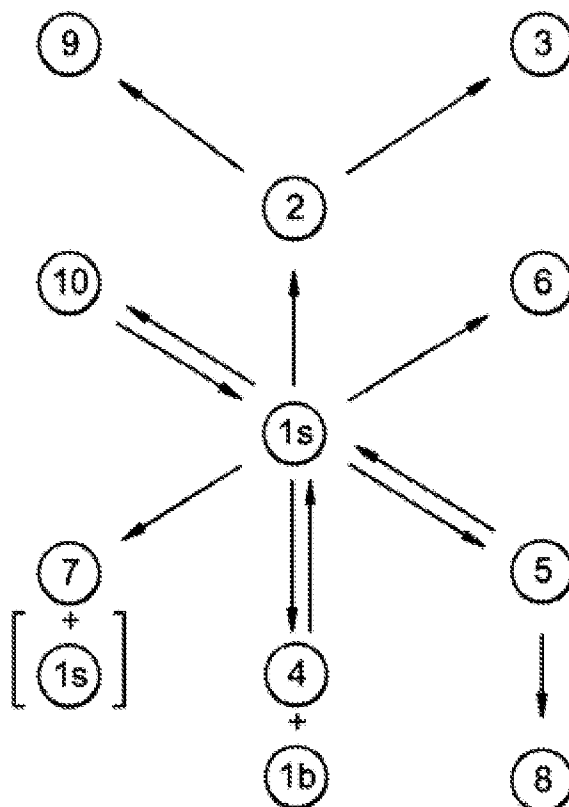


FIG. 3

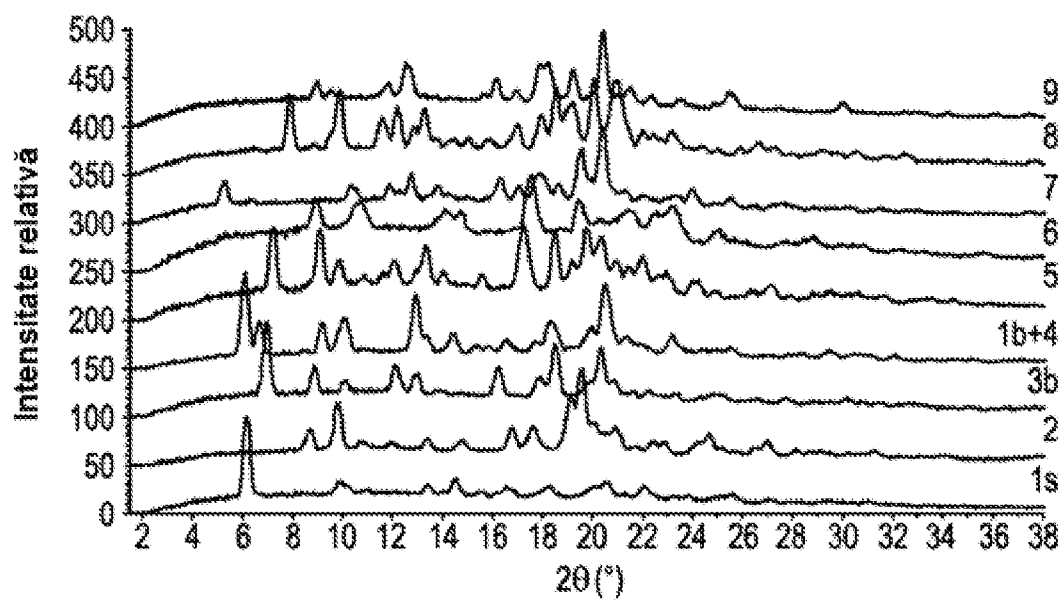


FIG. 4

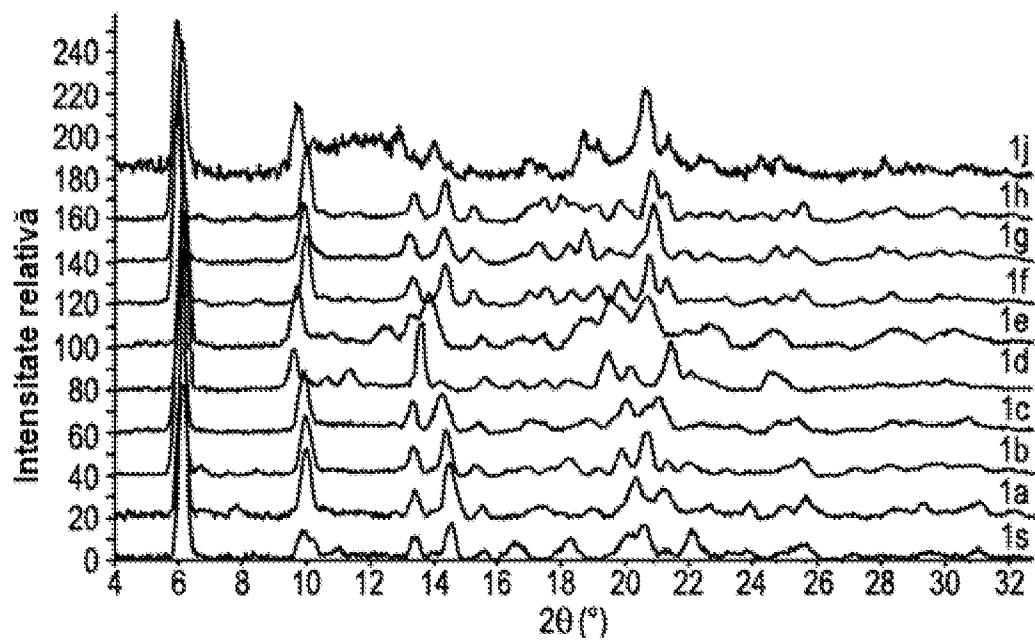


FIG. 5

