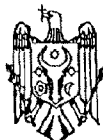




MD/EP 3672965 T2 2022.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3672965 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 31/506** (2006.01.01)
A61K 45/06 (2006.01.01)
A61P 17/00 (2006.01.01)
A61P 17/14 (2006.01.01)
A61P 37/06 (2006.01.01)
C07D 451/14 (2006.01.01)
C07D 451/04 (2006.01.01)
C07D 403/12 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0681 (22) Data de depozit: 2018.10.26 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18801171.2, 2018.10.26 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3672965, 2020.07.01 (31) Numărul cererii prioritare: 201762577852 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.10.27 (33) Țara cererii prioritare: 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. 36/2022, 2022.09.07 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2020, 2020.07.31
(71) Solicitant: THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC, US (72) Inventatori: KOZAK Jennifer, US; HUDSON Ryan, US; BRANDT Gary E.L., US; MCKINNELL Robert Murray, US; DABROS Marta, US; NZEREM Jerry, US (73) Titular: THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC, US (74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia	

(54) Compusi ai pirimidinei ca inhibitori ai kinazei JAK

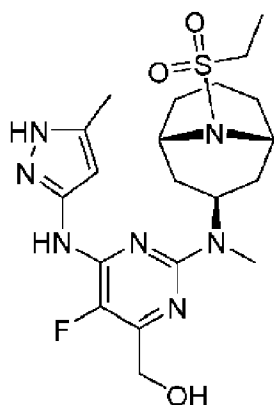
(57) Rezumat:

1

Invenția furnizează un compus cu formula (I):

2

MD/EP 3672965 T2 2022.12.31



(I)

sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic, care este un inhibitor al kinazei JAK. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții farmaceutice care cuprind un asemenea compus, o formă cristalină, metode de folosire a unui asemenea compus pentru a trata bolile inflamatorii ale pielii și alte boli, și procedee și intermediari utili pentru prepararea unui asemenea compus.

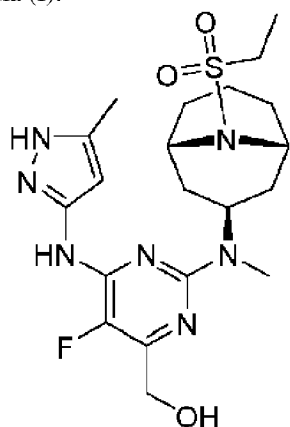
Revendicări: 29

Figuri: 8

(54) Pyrimidine compound as JAK kinase inhibitor

(57) Abstract:

1
The invention provides a compound of formula (I):



(I)

or a pharmaceutically-acceptable salt thereof, that is an inhibitor of JAK kinases. The invention also provides pharmaceutical compositions comprising such compound, a

2
crystalline form, methods of using such compound to treat inflammatory skin diseases and other diseases, and processes and intermediates useful for preparing such compound.

Claims: 29

Fig.: 8

Descriere:

(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

CONTEXTUL INVENȚIEI**5 Domeniul invenției**

Invenția este direcționată către un compus al pirimidinei util ca inhibitor al kinazei JAK. Invenția este îndreptată, de asemenea, către compoziții farmaceutice care cuprind un asemenea compus, formele cristaline ale unor asemenea compuși și procedeele și intermediarii utili pentru prepararea unui asemenea compus.

10 Stadiul tehnicii

Inhibarea familiei de enzime JAK poate inhiba semnalizarea multor citokine proinflamatorii cheie. Astfel, inhibitorii JAK sunt probabil utili în tratamentul dermatitei atopice și al altor boli inflamatorii ale pielii, rinitei alergice, astmului, bolii pulmonare obstructive cronice (BPOC) și altor boli inflamatorii pulmonare, colitei ulcerative și altor boli inflamatorii gastrointestinale, precum și boli oculare inflamatorii. WO2016/191524, US2016/052930 și WO2015/094803 sunt documente de brevet direcționate către compuși pentru utilizare ca inhibitori ai kinazei JAK.

Dermatita atopică (DA) este o boală inflamatorie cronică obișnuită a pielii care afectează aproximativ 14 milioane de oameni numai în Statele Unite. Se estimează că AD afectează 10 până la 20% dintre copii și 1 până la 3% dintre adulți din țările dezvoltate (Bao și colab., JAK-STAT, 2013, 2, e24137), și prevalența este în creștere. Creșterea citokinelor proinflamatorii care se bazează pe calea JAK-STAT, în special, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN γ și TSLP a fost asociată cu AD (Bao și colab., Leung și colab., The Journal of Clinical Investigation, 2004, 113, 651-657). În plus, reglarea în aval a IL-31, o altă citokină care semnalează printr-o împerechere JAK, s-a dovedit a avea un rol în pruritului asociat cu starea cronică a AD (Sonkoly și colab., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2006, 117, 411-417).

Datorită efectului modulator al căii JAK/STAT asupra sistemului imunitar, expunerea sistemică la inhibitorii JAK poate avea un efect imunosupresor sistemic advers. Prin urmare, ar fi de dorit să se furnizeze un nou inhibitor JAK care să-și aibă efectul la locul de acțiune fără efecte sistemice semnificative. În special, pentru tratamentul bolilor inflamatorii ale pielii, cum ar fi dermatita atopică, ar fi de dorit să se furnizeze un nou inhibitor JAK care să poată fi administrat local și să realizeze o expunere relevantă din punct de vedere terapeutic în piele, care este îndepărtată rapid pentru a minimiza expunerea sistemică.

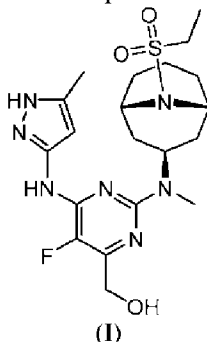
SUMARUL INVENȚIEI

Scopul invenției este definit de revendicări.

Oricare din referințele din descriere la metodele de tratament se referă la compuși, compoziții farmaceutice și medicamente din prezenta invenție pentru utilizare într-o metoda de tratament pentru om (sau corpul animal prin terapie (sau pentru diagnostic)).

Intr-un aspect, invenția furnizează un compus având activitate ca un inhibitor al kinazei JAK.

În conformitate, invenția furnizează un compus cu formula (I):



40

sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Invenția furnizează, de asemenea, o formă cristalină a compusului (I).

Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție farmaceutică care cuprinde compusului (I) și un purtător acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

45

Invenția furnizează, de asemenea, un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea bolilor inflamatorii și autoimune ale pielii, în particular a dermatitei atopice și a alopeciei aerate, la un mamifer, metoda cuprinzând administrarea compusului (I), sau a unei săruri a acestuia acceptabile din punct de vedere farmaceutic, la un mamifer.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

5 Figura 1 prezintă un model de difracție cu raze X pe pulbere (PXRD) al Formei I cristaline a compusului (I) (denumită în continuare Forma I).

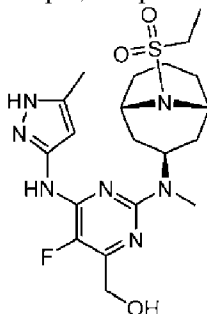
Figura 3 prezintă un grafic al analizei gravimetrice termice (TGA) a Formei I cristaline.

10 Figura 5 prezintă un model de difracție cu raze X pe pulbere (PXRD) al Formei II cristaline a compusului (I) (denumită în continuare Forma II).

Figura 7 prezintă un grafic al analizei gravimetrice termice (TGA) a Formei cristaline II.

15 **DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENTIEI**

denumite aici conform convențiilor IUPAC așa cum sunt implementate în software-ul ChemDraw (PerkinElmer, Inc., Cambridge, MA). De exemplu, compusul (I):



(I)

25 Notația (1R,3s,5S) descrie orientarea *exo* a grupării pirimidinilamino față de gruparea 9-azabiciclol[3.3.1]nonan.

30 Compușii din dezvăluire conțin unul sau mai mulți centri chirali și, prin urmare, asemenea compuși (și intermediari ai acestora) pot exista ca amestecuri racemice; stereoisomeri puri (adică, enantiomeri sau diastereomeri); amestecuri îmbogățite în stereoisomeri și altele asemenea. Compușii chirali prezentați sau numiți aici fără o stereochimie definită la un centru chiral sunt menționați a include oricare sau toate variațiile stereoisomerului posibil la stereocentrul nedefinit, dacă nu se indică altfel.

40 Compusul (I) poate exista sub formă liberă sau sub diferite forme de sare, cum ar fi o formă de sare mono-protonată, o formă de sare di-protonată, o formă de sare tri-protonată sau amestecuri ale acestora. Toate aceste forme sunt incluse în scopul acestei invenții, dacă nu se indică altfel.

Această invenție include, de asemenea, versiuni marcate izotopic ale compușilor din dezvoltare, inclusiv compusul (I), în care un atom a fost înlocuit sau îmbogățit cu un atom având același număr atomic, dar o masă atomică diferită de masa atomică care predomină în natură. Exemple de izotopi care pot fi încorporați într-un compus cu formula (I) includ, dar nu se limitează la, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S , și ^{18}F . De interes deosebit sunt compușii cu formula (I) îmbogății în tritium sau carbon-14, compuși care pot fi utilizați, de exemplu, în studiile de distribuție tisulară. De asemenea, de interes deosebit sunt compușii cu formula (I) îmbogății în deuteriu în special la un loc de metabolism, compuși care sunt de așteptat să aibă o stabilitate metabolică mai mare. În plus, de interes deosebit sunt compușii cu formula (I) îmbogății într-un izotop emițător de pozitroni, cum ar fi ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O și ^{13}N , compuși care pot fi folosiți, de exemplu, în studii de tomografie cu emisie de pozitroni (PET).

Definiții

Când se descrie această invenție, incluzând diferitele sale aspecte și exemple de realizare, următorii termeni au următoarele semnificații, dacă nu se indică altfel. Termenul "alchil" înseamnă o grupare hidrocarbură monovalentă saturată care poate fi liniară sau ramificată sau combinații ale acestora. Dacă nu este definit altfel, asemenea grupări alchil conțin tipic de la 1 la 10 atomi de carbon. Grupări alchil reprezentative includ, de exemplu, metil (Me), etil (Et), n-propil (n-Pr) sau (nPr), izopropil (i-Pr) sau (iPr), n-butil (n-Bu) sau (nBu), sec-butil, izobutil, tert-butil (t-Bu) sau (tBu), n-pentil, n-hexil, 2,2-dimetilpropil, 2-metilbutil, 3-metilbutil, 2-etilbutil, 2,2-dimetilpentil, 2-propil pentil, și asemănător.

Când un anumit număr de atomi de carbon este destinat unui anumit termen, numărul de atomi de carbon este afișat înainte de termen. De exemplu, termenul "alchil C₁₋₃" înseamnă o grupare alchil având de la 1 la 3 atomi de carbon în care atomii de carbon sunt în orice configurație acceptabilă din punct de vedere chimic, inclusiv configurații liniare sau ramificate.

Termenul "alcoxi" înseamnă o grupare -O-alchil monovalentă, unde alchilul este definit ca mai sus. Grupările alcoxi reprezentative includ, de exemplu, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, și asemănător.

Termenul "cicloalchil" înseamnă o grupare carbociclică saturată monovalentă care poate fi monociclică sau multiciclică. Dacă nu este definit altfel, ca grupările cicloalchil conțin tipic de la 3 la 10 atomi de carbon. Grupări cicloalchil reprezentative includ, de exemplu, ciclopropil (cPr), ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, cicloheptil, ciclooctil, adamantil și asemănător.

Termenul "halogen" înseamnă fluor, clor, bromo sau iod.

Termenul "heterociclic", "heterociclu", "heterociclic" sau "ciclu heterociclic" înseamnă o grupare nearomatică ciclică monovalentă saturată sau parțial nesaturată, având de la 3 până la 10 atomi în ciclu total, în care ciclul conține de la 2 până la 9 atomi de carbon în ciclu și de la 1 la 4 heteroatomi în ciclu selectați dintre azot, oxigen și sulf. Grupările heterociclice pot fi monociclice sau multiciclice (adică, condensate sau în punte). Grupările heterociclice reprezentative includ, de exemplu, piroolidinil, piperidinil, piperazinil, imidazolidinil, morfolinil, tiomorfolinil, indolin-3-il, 2-imidazolinil, tetrahidropiraniil, 1,2,3,4-tetrahidroizochinolin-2-il, chinuclidinil, 7-azanorbomanil, nortropanil, și asemănător, unde punctul de atașament este la orice atom de carbon sau azot disponibil din inel. Unde contextul face ca punctul de atașament ale grupării heterociclice să fie evident, asemenea grupări pot fi menționate alternative ca o secție non-valentă adică pirolidina, piperidina, piperazina, imidazol, tetrahidropiran etc.

Termenul "cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic" înseamnă o cantitate suficientă pentru a efectua tratamentul atunci când este administrată unui pacient care are nevoie de tratament.

Termenul "tratament" așa cum este utilizat aici înseamnă tratamentul unei boli, tulburări sau afecțiuni medicale (cum ar fi o boală inflamatorie gastrointestinală), la un pacient, cum ar fi un mamifer (în particular un om), care include unul sau mai multe dintre următoarele:

- (a) prevenirea apariției bolii, tulburării sau stării medicale, adică prevenirea reapariției bolii sau stării medicale sau a tratamentului profilactic al unui pacient care este predispus la boala sau starea medicală;
- (b) ameliorarea bolii, tulburării sau stării medicale, adică eliminarea sau provocarea regresiei bolii, tulburării sau stării medicale la un pacient, inclusiv contracararea efectelor altor agenți terapeutici;
- (c) suprimarea bolii, tulburării sau stării medicale, adică încetinirea sau oprirea dezvoltării bolii, tulburării sau stării medicale la un pacient; sau
- (d) atenuarea simptomelor bolii, tulburării sau stării medicale la un pacient.

Termenul "sare acceptabilă farmaceutic" înseamnă o sare care este acceptabilă pentru administrare la un pacient sau un mamifer, cum ar fi un om (de exemplu, săruri care au o siguranță acceptabilă la mamifere pentru un anumit regim de dozare). Sărurile reprezentative acceptabile din punct de vedere farmaceutic includ săruri ale acidului acetic, ascorbic, benzensulfonic, benzoic, camforsulfonic, citric, etansulfonic, edisilic, fumaric, gentisic, gluconic, glucoronic, glutamic, hipuric, bromhidric, clorhidric, isetionic, lactic, lactobionic, maleic, malic, mandelic, metansulfonic, mucic, naftalensulfonic, naftalen-1,5-disulfonic, naftalen-2,6-disulfonic, nicotinic, nitric, orotic, pamoic, pantotenic, fosforic, succinic, sulfuric, tartaric, p-toluensulfonic și xinafoic și asemănător.

Termenul „sare a acestuia” înseamnă un compus format atunci când hidrogenul unui acid este înlocuit cu un cation, cum ar fi un cation metalic sau un cation organic și asemănător. De exemplu, cationul poate fi o formă protonată a unui compus cu formula (I), adică o formă în care una sau mai multe grupări amino au fost protonate de un acid. În mod obișnuit, sarea este o sare acceptabilă farmaceutic, deși acest lucru nu este necesar pentru sărurile compușilor intermediari care nu sunt destinate administrării unui pacient.

Termenul „grupare protectoare amino” înseamnă o grupare protectoare adecvată pentru prevenirea reacțiilor nedorite la un azot amino. Grupările reprezentative amino-protectoare includ, dar nu sunt limitate la, formil; grupări acil, de exemplu grupări alcanoil, cum ar fi acetil și tri-fluoracetil; grupări alcocarbonil, cum ar fi terț-butoxicarbonil (Boc); grupări arilmetoxycarbonil, cum ar fi benziloxycarbonil (Cbz) și 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc); grupări arilmetil, cum ar fi benzil (Bn), tritil (Tr) și 1,1-di-(4'-

metoxifenil)metil; grupări silil, cum ar fi trimetilsilil (TMS), triizopropil siliil (TIPS), terț-butil dimetilsilil (TBS sau TBDMS), [2-(trimetilsilil)-etoxi]metil (SEM); și asemănător. Numeroase grupări protectoare și introducerea și îndepărtarea lor sunt descrise în T. W. Greene și P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York

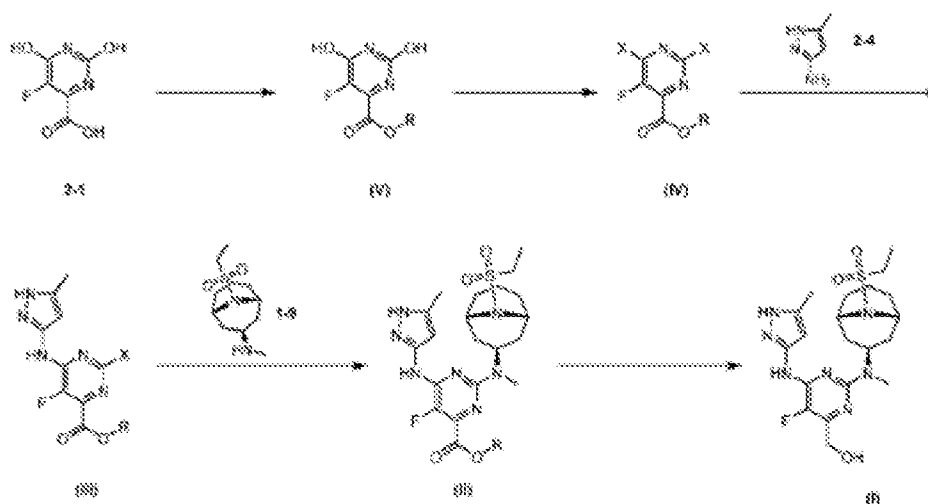
5 **Proceduri generale de sinteză**

Compusul (I) și intermediarii acestuia pot fi preparați conform următoarelor metode și proceduri generale utilizând materii prime și reactivi disponibili comercial sau preparați în mod obișnuit. Substituenții și variabilele (de exemplu, R și X) utilizați în următoarele scheme au aceleași semnificații ca cele definite în altă parte aici, dacă nu se indică altfel. În plus, compușii având un atom acid sau bazic sau o grupare funcțională pot fi utilizați sau pot fi produși ca sare, dacă nu se indică altfel (în unele cazuri, utilizarea unei sări într-o anumită reacție va necesita conversia sării într-o formă de non-sare, de exemplu, o bază liberă, folosind proceduri de rutină înainte de a efectua reacția).

Deși un exemplu de realizare particular al prezentei invenții poate fi prezentat sau descris în procedurile care urmează, specialiștii în domeniu vor recunoaște că alte exemple de realizare sau aspecte ale prezentei invenții pot fi, de asemenea, preparate folosind astfel de proceduri sau prin utilizarea altor metode, reactivi și materii prime cunoscute specialiștilor în domeniu. În particular, se va aprecia că compusul (I) poate fi preparat printr-o varietate de căi de proces în care reactanții sunt combinați în ordine diferită pentru a furniza diferiți intermediari pe calea spre producerea produsului final.

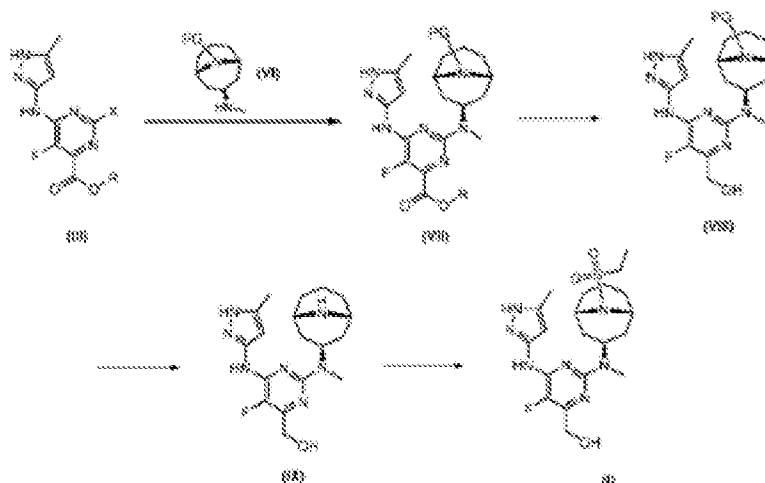
Metodele generale de preparare a compusului (I) sunt ilustrate în schemele 1 și 2.

Schema 1



Materia primă 2-1 poate fi transformată în ester (V), prin reacția cu un alcool în prezența unui acid, unde R este o grupare alchil. În unele exemple de realizare, R este o grupare alchil C₁₋₁₂. În unele exemple de realizare, alcoolul este etanol. Compusul (V) poate fi transformat în compusul di-halo (IV). În unele exemple de realizare, (IV) este un analog di-cloro. În unele exemple de realizare, reactivul este POC_l3. Compusul (IV) poate fi transformat în (III) prin reacția cu 2-4 în prezența unei baze. Compusul (II) poate fi format prin reacția (III) cu 1-9 în prezența unei baze. În final, (II) poate fi redus la (I) în prezența unui agent reducător. În unele exemple de realizare, agentul reducător este o sursă de hidrură de litiu sau de sodiu. În unele exemple de realizare, agentul de reducere este LiAlH₄, NaBH₄ sau LiBH₄. În unele exemple de realizare, R este etil. Opțional, poate fi formată o sare acceptabilă farmaceutic a lui (I).

Pentru această metodă generală, în unele exemple de realizare, R este un C₁₋₁₂ alchil. În unele exemple de realizare, R este un C₁₋₆ alchil. În unele exemple de realizare, R este un C₁₋₃ alchil. În unele exemple de realizare, R este etil. În unele exemple de realizare, X este F, Cl sau Br. În unele exemple de realizare, X este Cl. În unele exemple de realizare, R este etil și X este Cl.

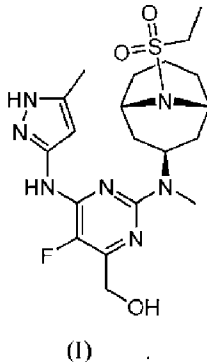
Schema 2

Alternativ, compusul (III) poate fi reacționat cu compusul (VI) în care PG este o grupare protectoare amino, în prezența unei baze, cum ar fi DIPEA, pentru a da compusul (VII). Compusul (VII) poate fi redus la alcoolul corespunzător (VIII) cu un agent reducător. În unele exemple de realizare, agentul reducător este o sursă de hidruură de litiu sau de sodiu. În unele exemple de realizare, agentul reducător este LiAlH_4 , NaBH_4 sau LiBH_4 . Compusul (VIII) poate fi deprotejat pentru a da compusul (IX). Când PG este Boc, deprotejarea poate fi efectuată în prezența unui acid puternic, cum ar fi TFA sau HCl. În cele din urmă, compusul (IX) poate fi reacționat cu o sursă de etansulfonil, cum ar fi clorura de etansulfonil.

Pentru această metodă generală, în unele exemple de realizare, PG este terț-butoxicarbonil (Boc). În unele exemple de realizare, R este un C_{1-12} alchil. În unele exemple de realizare, R este un C_{1-6} alchil. În unele exemple de realizare, R este un C_{1-3} alchil. În unele exemple de realizare, R este etil. În unele exemple de realizare, X este F, Cl sau Br. În unele exemple de realizare, X este Cl. În unele exemple de realizare, R este etil și X este Cl.

Forma cristalină I

Intr-un alt aspect, dezvoltarea furnizează o formă cristalină (Forma I) a compusului (I)



Într-un aspect, forma cristalină este caracterizată printr-o difracție de raze X în pulbere cuprinzând vârfuri de difracție la valori 2θ de 11.19 ± 0.20 , 11.73 ± 0.20 , 18.80 ± 0.20 și 19.29 ± 0.20 . Într-un alt aspect, forma cristalină este caracterizată suplimentar prin faptul că are un vârf de difracție suplimentar la o valoare 2θ de 6.75 ± 0.20 . Într-un alt aspect, forma cristalină este caracterizată în plus prin faptul că are două sau mai multe vârfuri de difracție suplimentare la valori 2θ selectate dintre 5.91 ± 0.20 , 6.28 ± 0.20 , 8.08 ± 0.20 , 16.68 ± 0.20 , 17.62 ± 0.20 , 20.53 ± 0.20 , și 22.16 ± 0.20 .

Așa cum este bine cunoscut în domeniul difracției cu raze X pe pulbere, pozițiile vârfurilor modelelor PXRD sunt relativ mai puțin sensibile la detaliile experimentale, cum ar fi detaliile de preparare a probei și geometria instrumentului, decât sunt înălțimile relative ale vârfurilor. Astfel, într-un aspect, Forma cristalină I este caracterizată printr-un model de difracție cu raze X în pulbere în care pozițiile vârfurilor sunt în mod substanțial în conformitate cu pozițiile vârfurilor modelului prezentat în Figura 1.

Într-un alt aspect, Forma cristalină I este caracterizată prin comportamentul său atunci când este expusă la temperaturi ridicate. După cum se demonstrează în Figura 2, calorimetria de scanare

diferențială (DSC) înregistrată la o viteză de încălzire de 10 °C pe minut prezintă un vârf al fluxului de căldură endotermic, identificat ca o tranziție la topire, care arată un maxim al fluxului de căldură endotermic la o temperatură de 250,9 °C ± 2 °C. Într-un alt aspect, Forma I este caracterizată printr-o calorimetrie cu scanare diferențială în mod substanțial în conformitate cu cea prezentată în Figura 2.

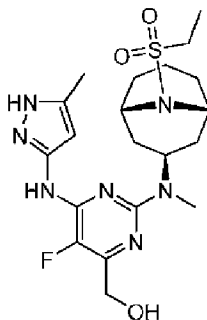
Analiza gravimetrică termică (TGA) din Figura 3 prezintă o pierdere în greutate de aproximativ 0,70 % între 22 °C și 125 °C, sub purjare cu N₂. Compusul se descompune la o temperatură de debut de aproximativ 250 °C.

Așa cum este descris în Preparatul 2, Forma I poate fi preparată prin dizolvarea compusului (I) în etanol la încălzire. Soluția rezultată este apoi răcită la aproximativ 25 °C. Forma I poate fi izolată prin filtrare.

Într-un alt aspect, invenția furnizează o metodă de preparare a Formei cristaline I, metoda cuprinzând: (a) dizolvarea compusului (I) într-un diluant cum ar fi etanol și, opțional, aplicarea încălzirii pentru a forma un amestec de reacție; (b) răcirea soluției la aproximativ 25 °C cu agitare opțională; și (c) izolarea Formei I cristaline din amestecul de reacție, de exemplu prin filtrare.

Forma cristalină II

Într-un alt aspect, invenția furnizează o formă cristalină (Forma II) a compusului (I):



(I)

care este o formă cristalină anhidră a bazei libere.

Într-un aspect, forma cristalină este caracterizată printr-o difracție de raze X în pulbere cuprinzând vârfuri de difracție la valorile 2θ de 11.4±0.2, 16.2±0.2, 16.6±0.2, 17.7±0.2, și 21.9±0.2.

Într-un alt aspect, forma cristalină este caracterizată în plus prin faptul că are vârfuri de difracție suplimentare la valorile 2θ de 8.9±0.2, 9.5±0.2, și 10.2±0.2.

Într-un alt aspect, forma cristalină este caracterizată în plus prin faptul că are două sau mai multe vârfuri de difracție suplimentare la valori 2θ selectate dintre 14.4±0.2, 19.0±0.2, 19.2±0.2, 19.8±0.2, 20.1±0.2, 20.4±0.2, 20.6±0.2, 20.8±0.2, 21.3±0.2, 25.9±0.2, 30.1±0.2, 30.5±0.2, 30.9±0.2, 32.6±0.2, și 33.8±0.2.

După cum este bine cunoscut în domeniul difracției cu raze X pe pulbere, pozițiile vârfurilor modelelor PXRD sunt relativ mai puțin sensibile la detalii experimentale, cum ar fi detaliile preparării probei și geometria instrumentului, decât sunt înălțimile relative ale vârfurilor. Astfel, într-un aspect, Forma cristalină II este caracterizată printr-un model de difracție cu raze X în pulbere în care pozițiile vârfurilor sunt în mod substanțial în concordanță cu pozițiile vârfurilor modelului prezentat în Figura 5.

Într-un alt aspect, Forma II cristalină se caracterizează prin comportamentul său atunci când este expusă la temperaturi ridicate. După cum se demonstrează în Figura 6, calorimetria de scanare diferențială (DSC) înregistrată la o viteză de încălzire de 10 °C pe minut prezintă un vârf al fluxului de căldură endotermic, identificat ca o tranziție la topire, care arată un maxim al fluxului de căldură endotermic la o temperatură de 238,1 °C ± 2 °C. Într-un alt aspect forma II este caracterizată printr-o calorimetrie cu scanare diferențială în mod substanțial în conformitate cu cea prezentată în Figura 6.

Urma analizei gravimetrice termice (TGA) din Figura 7 prezintă o pierdere în greutate asociată cu descompunerea după 222 °C.

O urmă reprezentativă DMS pentru Forma II este prezentată în Figura 8. Absorbția totală de umiditate între 5 și 90% RH a fost de aproximativ 0,02%. Forma II este ne higroscopică.

Așa cum este descris în Preparatul 20, Forma II poate fi preparată prin suspendarea compusului 2-6 într-un amestec de EtOH și THF, răcit la 5°C. La această suspensie se poate adăuga LiBH₄. După adăugare, temperatura poate fi crescută la 10 °C, și amestecul de reacție poate fi agitat timp de 2 ore. Reacția poate fi stinsă cu un amestec de clorură de amoniu dizolvată în apă. După încălzire la 45 °C, apa poate fi adăugată încet pentru a genera cristale. Suspensia rezultată poate fi menținută la 45 °C timp de câteva ore, apoi poate fi agitată la 15 °C și filtrată. Forma cristalină Forma II poate fi clătită cu EtOH și apă și apoi uscată pentru a da forma II de grad intermediar.

Această intermediar poate fi dizolvat în DMSO la încălzire urmată de adăugarea lentă de n-PrOH menținând în același timp temperatura internă la aproximativ 86°C. Amestecul este agitat la aproximativ 92°C timp de aproximativ 4 ore. Amestecul rezultat este apoi răcit lent la aproximativ 20°C și agitat la aproximativ 20°C timp de câteva ore. Forma II poate fi apoi izolată prin filtrare. Forma cristalină II poate fi spălată cu nPrOH și etanol urmat de filtrare.

Într-un alt aspect, descrierea furnizează o metodă de purificare a Formei cristaline II de grad intermediar, metoda cuprinzând: (a) dizolvarea Formei II cu grad intermediar într-un diluant cum ar fi DMSO și aplicarea încălzirii amestecului; (b) adăugarea lentă de n-PrOH; (c) încălzirea amestecului la aproximativ 90 °C; (d) răcirea soluției la aproximativ 20 °C; și (e) izolarea formei cristaline II din amestecul de reacție, de exemplu prin filtrare.

Compoziții farmaceutice

Compusul (I) și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestuia sunt utilizate în mod obișnuit sub forma unei compoziții sau formulări farmaceutice. Compusul (I) poate fi prezent ca o formă cristalină, cum ar fi Forma I sau Forma II. Astfel de compoziții farmaceutice pot fi administrate unui pacient prin orice cale acceptabilă de administrare incluzând, dar fără a se limita la, modurile de administrare orală, topică (inclusiv transdermică), rectală, nazală, inhalabilă și parenterală.

În consecință, într-unul dintre aspectele sale legate de compoziție, invenția se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și compus (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic. Într-un alt aspect al compoziției, invenția se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și o formă cristalină a compusului (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, de exemplu Forma I sau Forma II. Opțional, astfel de compoziții farmaceutice pot conține alți agenți terapeutici și/sau de formulare dacă se dorește. Când se discută despre compoziții și utilizări ale acestora, „compusul invenției” poate fi denumit aici și „agent activ”.

Compozițiile farmaceutice din această dezvăluire conțin în mod obișnuit o cantitate eficientă terapeutic de compus (I), sau să fie o astfel de acceptabilă din punct de vedere farmaceutic. Specialiștii în domeniu vor recunoaște, totuși, că o compoziție farmaceutică poate conține mai mult decât o cantitate eficientă terapeutic, adică compoziții în vrac, sau mai puțin decât o cantitate eficientă terapeutic, adică doze unitare individuale concepute pentru administrare multiplă pentru a obține o cantitate eficientă terapeutic.

De obicei, astfel de compoziții farmaceutice vor conține de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 95% în greutate agent activ; incluzând de la aproximativ 5 până la aproximativ 70% în greutate agent activ.

Orice purtător sau excipient convențional poate fi utilizat în compozițiile farmaceutice ale invenției. Alegerea unui anumit purtător sau excipient, sau combinații de purtători sau excipienți, va depinde de modul de administrare utilizat pentru a trata un anumit pacient sau tip de stare medicală sau stare de boală. În această privință, prepararea unei compoziții farmaceutice adecvate pentru un mod particular de administrare este bine în domeniul de aplicare al specialiștilor în domeniul farmaceutic. În plus, purtătorii sau excipienții utilizați în compozițiile farmaceutice ale acestei invenții sunt disponibili comercial. Cu titlu de exemplu suplimentar, tehnicile convenționale de formulare sunt descrise în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Ediția a 20-a, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); și H.C. Ansel și colab., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery, ediția a 7-a, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Exemplele reprezentative de materiale care pot servi ca purtători acceptabili farmaceutic includ, dar nu se limitează la, următoarele: zaharuri, cum ar fi lactoza, glucoza și zaharoza; amidon, cum ar fi amidon de porumb și amidon de cartofi; celuloza, cum ar fi celuloza microcristalină, și derivații săi, cum ar fi carboximetil celuloza de sodiu, etil celuloza și acetatul de celuloză; tragacant pulbere; malț; gelatină; talc; excipienți, cum ar fi unt de cacao și ceară pentru supozitoare; uleiuri, cum ar fi ulei de arahide, ulei de semințe de bumbac, ulei de sofrân, ulei de susan, ulei de măsline, ulei de porumb și ulei de soia; glicoli, cum ar fi propilen glicol; polioli, cum ar fi glicerină, sorbitol, manitol și polietilen glicol; esteri, cum ar fi oleatul de etil și lauratul de etil; agar agar; agenți de tamponare, cum ar fi hidroxid de magneziu și hidroxid de aluminiu; acid alginic; apă apirogenă; soluție salină izotonică; soluția Ringer; alcool etil; soluții tampon fosfat; și alte substanțe compatibile netoxice utilizate în compozițiile farmaceutice.

Compozițiile farmaceutice sunt preparate în mod obișnuit prin amestecarea completă și intimă sau amestecarea agentului activ cu un purtător acceptabil farmaceutic și unul sau mai multe ingrediente opționale. Amestecul amestecat uniform rezultat poate fi apoi modelat sau încărcat în tablete, capsule, pastile și asemănător folosind proceduri și echipamente convenționale.

Compozițiile farmaceutice din această dezvăluire pot fi ambalate într-o formă de dozare unitară. Termenul "formă de dozare unitară" se referă la o unitate fizic discretă adecvată pentru dozarea unui pacient, adică fiecare unitate conținând o cantitate predeterminată de agent activ calculată pentru a produce efectul terapeutic dorit fie singură, fie în combinație cu una sau mai multe unități suplimentare.

De exemplu, astfel de forme de dozare unitară pot fi capsule, tablete, pilule, și asemănător, sau pachete unitare adecvate pentru administrare parenterală.

Într-un exemplu de realizare, compozițiile farmaceutice ale invenției sunt potrivite pentru administrare orală. Compozițiile farmaceutice potrivite pentru administrare orală pot fi sub formă de capsule, comprimate, pilule, pastile, cașete, drajeuri, pulberi, granule; sau ca o soluție sau o suspensie într-un lichid apos sau neapos; sau ca o emulsie lichidă ulei-în-apă sau apă-în-ulei; sau ca elixir sau sirop; și asemănător; fiecare conținând o cantitate predeterminată dintr-un compus din această dezvăluire, sau să fie aceasta acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, ca ingredient activ.

Atunci când sunt destinate administrării orale într-o formă solidă de dozare (adică sub formă de capsule, tablete, pastile și asemănător), compozițiile farmaceutice din această dezvăluire vor cuprinde în mod obișnuit agentul activ sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic. Opțional, astfel de forme de dozare solide pot cuprinde: materiale de umplură sau diluanți, cum ar fi amidon, celuloză microcristalină, lactoză, fosfat dicalcic, zaharoză, glucoză, manitol și/sau acid silicic; lianți, cum ar fi carboximetilceluloză, algiinați, gelatină, polivinil pirolidonă, zaharoză și/sau acacia; umectanți, cum ar fi glicerolul; agenți de dezintegrare, cum ar fi crosscarmeloza de sodiu, agar-agar, carbonat de calciu, amidon de cartofi sau de tapioca, acid alginic, anumiți silicați și/sau carbonat de sodiu; agenți de întârziere a soluției, cum ar fi parafina; acceleratori de absorbție, cum ar fi compuși de amoniu cuaternar; agenți de umectare, cum ar fi alcool cetilic și/sau monostearat de glicerol; absorbantți, cum ar fi caolin și/sau argilă bentonită; lubrifianti, cum ar fi talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, polietilen glicoli solizi, laurii sulfat de sodiu și/sau amestecuri ale acestora; agenți de colorare; și agenți de tamponare.

Agenții de eliberare, agenți de umectare, agenți de acoperire, agenți de îndulcire, de aromatizare și de parfumare, conservanți și antioxidanți pot fi de asemenea prezenți în compozițiile farmaceutice din această dezvăluire. Exemple de antioxidanți acceptabili farmaceutic includ: antioxidanți solubili în apă, cum ar fi acid ascorbic, clorhidrat de cisteină, bisulfat de sodiu, metabisulfat de sodiu, sulfat de sodiu și asemănător; antioxidanți solubili în ulei, cum ar fi palmitatul de ascorbil, hidroxianisolu butilat, hidroxitoluenul butilat, lecitina, galatul de propil, alfa-tocoferol și asemănător; și agenți de chelare a metalelor, cum ar fi acidul citric, acidul etilendiamină tetraacetic, sorbitolul, acidul tartric, acidul fosforic și asemănător. Agenții de acoperire pentru comprimate, capsule, pilule și altele asemenea, includ pe cei utilizați pentru acoperiri enterice, cum ar fi ftalatul de acetat de celuloză, ftalatul de acetat de polivinil, ftalatul de hidroxipropil metilceluloză, acidul metacrilic, copolimerii de ester al acidului metacrilic, trimelitatul de acetat de celuloză, trimelitatul de celuloză, hidroxipropililatul de celuloză, succinat de acetat de celuloză, și asemănător.

Compozițiile farmaceutice din această dezvăluire pot fi, de asemenea, formulate pentru a asigura eliberarea lentă sau controlată a agentului activ utilizând, de exemplu, hidroxipropil metilceluloză în proporții variate; sau alte matrici polimerice, lipozomi și/sau microsfele. În plus, compozițiile farmaceutice din această dezvăluire pot conține opțional agenți de opacizare și pot fi formulate astfel încât să elibereze ingredientul activ numai, sau preferențial, într-o anumită porțiune a tractului gastrointestinal, opțional, într-o manieră întârziată. Exemple de compoziții de înglobare care pot fi utilizate includ substanțe polimerice și ceruri. Agentul activ poate fi, de asemenea, sub formă micro-încapsulată, dacă este cazul, cu unul sau mai mulți dintre excipienții descriși mai sus.

Formele de dozare lichide adecvate pentru administrare orală includ, cu titlu ilustrativ, emulsii, microemulsii, soluții, suspensii, siropuri și elixiri acceptabile farmaceutic. Formele de dozare lichide cuprind, în mod obișnuit, agentul activ și un diluant inert, cum ar fi, de exemplu, apă sau alți solvenți, agenți de solubilizare și emulgatori, cum ar fi alcool etilic, alcool izopropilic, carbonat de etil, acetat de etil, alcool benzilic, benzoat de benzil, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, uleiuri (în special uleiuri din semințe de bumbac, arahide, porumb, germeni, măsline, ricin și susan), acid oleic, glicerol, alcool tetrahidrofurilic, polietilen glicoli și esteri ai acizilor grași ai sorbitanului și amestecuri ale acestora. Alternativ, anumite formulări lichide pot fi transformate, de exemplu, prin uscare prin pulverizare, într-o pulbere, care este utilizată pentru a prepara forme de dozare solide prin proceduri convenționale.

Suspensiile, în plus față de ingredientul activ, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pot conține agenți de suspendare, cum ar fi, de exemplu, alcooli izostearilici etoxilați, polioxietilen sorbitol și esteri de sorbitan, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar, și tragacanth și amestecuri ale acestora.

Compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, poate fi, de asemenea, administrat parenteral (de exemplu, prin injecție intravenoasă, subcutanată, intramusculară sau intraperitoneală). Pentru administrare parenterală, agentul activ, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este în mod obișnuit amestecat cu un vehicul adecvat pentru administrare parenterală incluzând, de exemplu, soluții apoase sterile, soluție salină, alcooli cu greutate moleculară mică, cum ar fi propilen glicol, polietilen glicol, uleiuri vegetale, gelatină, esteri ai acizilor grași precum oleatul de etil, și asemănător. Formulările parenterale pot conține, de asemenea, unul sau mai mulți antioxidanți,

solubilizanți, stabilizatori, conservanți, agenți de umectare, emulgatori, agenți de tamponare sau agenți de dispersie. Aceste formulări pot fi sterilizate prin utilizarea unui mediu injectabil steril, a unui agent de sterilizare, filtrare, iradiere sau căldură.

Alternativ, compozițiile farmaceutice din această dezvoltare sunt formulate pentru administrare prin inhalare. Compozițiile farmaceutice adecvate pentru administrare prin inhalare vor fi de obicei sub formă de aerosol sau pulbere. Astfel de compoziții sunt în general administrate utilizând dispozitive de eliberare binecunoscute, cum ar fi un inhalator cu doză măsurată, un inhalator cu pulbere uscată, un nebulizator sau un dispozitiv de eliberare similar.

Atunci când sunt administrate prin inhalare folosind un recipient sub presiune, compozițiile farmaceutice din această dezvoltare vor cuprinde în mod obișnuit ingredientul activ sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și un propulsor adecvat, cum ar fi diclorodifluorometan, triclorfluorometan, diclorotetrafluoretan, dioxid de carbon sau alt diclorotetrafluoretan gaz potrivit. În plus, compoziția farmaceutică poate fi sub formă de capsulă sau cartuș (fabricat, de exemplu, din gelatină) cuprinzând un compus al invenției, sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și o pulbere adecvată pentru utilizare într-un inhalator de pulbere. Bazele pulbere adecvate includ, de exemplu, lactoza sau amidonul.

Formulări topice

Pentru a trata afecțiunile pielii, compusul din invenție, sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este de preferință formulat pentru administrare topică pe piele. Compozițiile topice cuprind vehicule fluide sau semi-solide care pot include, dar nu se limitează la, polimeri, agenți de îngroșare, tampoane, neutralizatori, agenți de chelare, conservanți, agenți tensioactivi sau emulgatori, antioxidanți, ceară sau uleiuri, emolienți, creme de protecție solară și un solvent sau un sistem de amestec de solvent. Compozițiile topice utile în prezenta invenție pot fi făcute într-o mare varietate de tipuri de produse. Acestea includ, dar nu se limitează la, loțiuni, creme, geluri, bastoane, spray-uri, unguente, paste, spume, spume și produse de curățare. Aceste tipuri de produse pot cuprinde mai multe tipuri de sisteme purtători incluzând, dar fără a se limita la particule, nanoparticule și lipozomi. Dacă se dorește, pot fi adăugați agenți de dezintegrare, cum ar fi polivinil pirolidona reticulată, agar sau acid alginic sau o sare a acestuia, cum ar fi alginatul de sodiu. Tehnici de formulare și administrare pot fi găsite în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), Formularea poate fi selectată pentru a maximiza livrarea la un loc țintă dorit în organism.

Loțiunile, care sunt preparate care urmează să fie aplicate pe piele sau pe suprafața părului fără frecare, sunt în mod obișnuit preparate lichide sau semi-lichide în care sunt dispersate solide, ceruri sau lichide fin divizate. Loțiunile vor conține în mod obișnuit agenți de suspendare pentru a produce dispersii mai bune, precum și compuși utili pentru localizarea și menținerea agentului activ în contact cu pielea sau părul, de exemplu, metilceluloză, carboximetilceluloză de sodiu sau altele asemenea.

Cremele care conțin agentul activ, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru livrare conform prezentei dezvoltări sunt emulsii lichide sau semisolide vâscoase, fie ulei-în-apă, fie apă-în-ulei. Bazele de cremă sunt lavabile cu apă și conțin o fază uleioasă, un emulgator și o fază apoasă. Faza uleioasă este în general compusă din petrolatum sau un alcool gras, cum ar fi alcoolul cetilic sau stearilic; faza apoasă de obicei, deși nu neapărat, depășește faza uleioasă în volum și, conține, în general, un umectant. Emulgatorul dintr-o formulare de cremă, așa cum este explicat în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, este în general un surfactant neionic, anionic, cationic sau amfoter. Componentele formulărilor de cremă pot include: baze uleioase, cum ar fi petrolatum, uleiuri minerale, uleiuri vegetale și animale și trigliceride; baze de cremă, cum ar fi alcooli de lanolină, acid stearic și alcool cetostearilic; o bază de gel, cum ar fi alcoolul polivinilic; solvenți, cum ar fi, propilen glicol și polietilen glicol; emulgatori, cum ar fi polisorbați, stearați, cum ar fi stearat de gliceril, octilhidroxistearat, stearat de polioxil, eteri stearil PEG, palmitat de izopropil și monostearat de sorbitan; stabilizatori, cum ar fi polizaharide și sulfite de sodiu; emolienți (adică substanțe hidratante), cum ar fi trigliceride cu lanț mediu, miristat de izopropil și dimeticonă; agenți de rigidizare, cum ar fi alcoolul cetilic și alcoolul stearilic; agenți antimicrobieni, cum ar fi metilparaben, propil paraben, fenoxietanol, acid sorbic, diazolidinil uree și hidroxianisol butilat; intensificatori de penetrare, cum ar fi N-metilpirolidona, propilenglicol, monolaurat de polietilenglicol, și asemănător; și agenți de chelare, cum ar fi edetat disodic.

Formulările de gel pot fi de asemenea utilizate în legătură cu prezenta invenție. După cum va fi apreciat de cei care lucrează în domeniul formulării topice de medicamente, gelurile sunt semisolide. Gelurile monofazice conțin macromolecule organice distribuite în mod substanțial uniform în lichidul purtător, care este în mod obișnuit apos, dar poate fi și un solvent sau un amestec de solvenți.

Unguentele, care sunt preparate semisolide, se bazează în mod obișnuit pe petrolatum sau alți derivați ai petrolului. După cum va fi apreciat de către un specialist în domeniu, baza de unguent specifică care trebuie utilizată este una care asigură o administrare optimă a agentului activ ales pentru o formulare dată și, de preferință, asigură și alte caracteristici dorite, de exemplu, emoliență sau altele asemenea. Ca și în cazul altor vehicule sau vehicule, o bază de unguent trebuie să fie inertă, stabilă, neiritantă și

nesensibilizantă. După cum se explică în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Ed. 19. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), la paginile 1399-1404, bazele unguent pot fi grupate în patru clase: baze oleaginoase; baze emulsionabile; baze emulsie; și baze solubile în apă. Bazele unguente oleaginoase includ, de exemplu, uleiuri vegetale, grăsimi obținute de la animale și hidrocarburi semisolide obținute din petrol. Bazele de unguent emulsionabile, cunoscute și ca baze de unguent absorbante, conțin puțină apă sau deloc și includ, de exemplu, hidroxistearin sulfat, lanolină anhidră și petrolatum hidrofil. Bazele emulsiilor de unguent sunt fie emulsii apă-în-ulei (W/O), fie emulsii ulei-în-apă (O/W) și includ, de exemplu, alcool cetilic, monostearat de gliceril, lanolină și acid stearic. Bazele de unguent solubile în apă pot fi preparate din polietilen glicoli cu greutate moleculară diferită; din nou, se poate face referire la Remington: The Science and Practice of Pharmacy, supra, pentru mai multe informații. Materialele uleioase adecvate pentru utilizare în formulările de unguente includ vaselina (petrolatum), ceara de albine, untul de cacao, untul de shea și alcoolul cetilic. Unguentele pot include, în mod opțional, în plus, amplificatori de penetrare, dacă se dorește.

Formulările utile ale invenției includ, de asemenea, spray-uri. Spray-urile furnizează, în general, agentul activ într-o soluție apoasă și/sau alcoolică care poate fi pulverizată pe piele sau păr pentru livrare. Astfel de spray-uri le includ pe cele formulate pentru a asigura concentrația soluției de agent activ la locul de administrare după livrare, de exemplu, soluția de pulverizare poate fi compusă în principal din alcool sau alt lichid volatil asemănător în care medicamentul sau agentul activ poate fi dizolvat. La livrarea pe piele sau păr, purtătorul se evaporă, lăsând agentul activ concentrat la locul de administrare.

Compozițiile farmaceutice topice pot cuprinde, de asemenea, purtători adecvați în fază solidă sau gel. Exemple de astfel de purtători includ, dar nu sunt limitate la acestea, carbonat de calciu, fosfat de calciu, diferite zaharuri, amidonuri, derivați de celuloză, gelatină și polimeri cum ar fi polietilen glicoli.

Compozițiile farmaceutice topice pot cuprinde, de asemenea, un emulgator adecvat care se referă la un agent care îmbunătățește sau facilitează amestecarea și suspendarea ulei-în-apă sau apă-în-ulei. Agentul de emulsionare utilizat aici poate consta dintr-un singur agent de emulsionare sau poate fi un surfactant neionic, anionic, cationic sau amfoter sau un amestec de doi sau mai mulți astfel de agenți activi de suprafață; preferați pentru utilizare aici sunt emulgatorii neionici sau anionici. Asemenea agenți activi de suprafață sunt descriși în „McCutcheon's Detergent and Emulsifiers,” North American Edition, 1980 Annual publicat de McCutcheon Division, MC Publishing Company, 175 Rock Road, Glen Rock, NJ. 07452, SUA.

Pot fi utilizați alcooli cu greutate moleculară mare, cum ar fi alcoolul cetearilic, alcoolul cetilic, alcoolul stearilic, ceara emulsionantă, monostearat de gliceril. Alte exemple sunt distearat de etilen glicol, tristearat de sorbitan, monostearat de propilen glicol, monooleat de sorbitan, monostearat de sorbitan (SPAN 60), monolaurat de dietilen glicol, monopalmitat de sorbitan, dioleat de zaharoză, stearat de zaharoză (CRODESTA F- 160), polioxietilen lauril eter (BRIJ 30), polioxietilen (2) stearyl eter (BRIJ 72), polioxietilen (21) stearyl eter (BRIJ 721), monostearat de polioxietilen (Myrj 45), monostearat de polioxietilen sorbitan (TWEEN 60), monooleat de polioxietilen sorbitan (TWEEN 80), monolaurat de polioxietilen sorbitan (TWEEN 20) și oleat de sodiu. Colesterolul și derivații de colesterol pot fi, de asemenea, utilizați în emulsii utilizate extern.

Exemple de agenți de emulsionare neionici adecvați sunt descrise de Paul L. Lindner în „Emulsions and Emulsion”, editat de Kenneth Lissant, publicat de Dekker, New York, N. Y., 1974. Exemple de emulgatori neionici care pot fi utilizați includ, dar nu se limitează la produse BRIJ, cum ar fi BRIJ 2 (un polioxietilen (2) stearyl eter), BRIJ S20 (un polioxietilen (20) stearyl eter), BRIJ 72 (un polioxietilen (2) stearyl eter având un HLB de 4.9), BRIJ 721 (un polioxietilen (21) stearyl eter având un HLB de 15.5), Brij 30 (un polioxietilen lauril eter având un HLB de 9,7), Polawax (ceară emulsionantă având un HLB de 8.0), Span 60 (monostearat de sorbitan având un HLB de 9.7).), Crodesta F-160 (stearat de zaharoză" având un HLB de 14,5).

Compozițiile farmaceutice topice pot conține, de asemenea, emolienți adecvați. Emolienții sunt materiale folosite pentru prevenirea sau ameliorarea uscăciunii, precum și pentru protecția pielii sau a părului. Emolienții utili includ, dar nu se limitează la, alcoolul cetilic, miristatul de izopropil, alcoolul stearilic și asemănător. O mare varietate de emolienți adecvați sunt cunoscuți și pot fi utilizați aici. Vezi, de exemplu, Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, Ediția a II-a, Vol. 1, pp. 32-43 (1972), și brevetul U.S. 4.919.934, al lui Deckner și colab., eliberat la 24 aprilie 1990, ambele fiind încorporate aici ca referință în întregime.

Compozițiile farmaceutice topice pot conține, de asemenea, antioxidanți adecvați, substanțe cunoscute că inhibă oxidarea. Antioxidanții adecvați pentru utilizare în conformitate cu prezenta invenție includ, dar nu se limitează la, hidroxitoluen butilat, acid ascorbic, ascorbat de sodiu, ascorbat de calciu, palmitat ascorbic, hidroxianisol butilat, 2,4,5-trihidroxibutirofenonă, 4-hidroximetil- 2,6-di-tert-butil fenol, acid eritorbic, gumă guaiac, propil galat, acid tiodipropionic, dilauril tiodipropionat, tert-butil hidrochinonă și tocoferoli precum vitamina E, și asemănător, inclusiv sărurile și esterii acceptabili farmaceutic ai acestor compuși. De preferință, antioxidantul este hidroxitoluen butilat, hidroxianisol

butilat, galat de propil, acid ascorbic, săruri sau esteri ai acestora acceptabili farmaceutic sau amestecuri ale acestora. Cel mai preferabil, antioxidantul este hidroxitoluen butilat.

Compozițiile farmaceutice topice pot conține, de asemenea, conservanți adecvați. Conservanții sunt compuși adăugați la o formulare farmaceutică pentru a acționa ca un agent antimicrobian. Printre conservanții cunoscuți în domeniu ca fiind eficienți și acceptabili în formulările parenterale sunt clorură de benzalconiu, benzetoniu, clorhexidină, fenol, m-crezol, alcool benzilic, metilparaben, propil paraben, clorbutanol, o-crezol, p-crezol, clorocrezol, nitrat fenilmercuric, timerosal, acid benzoic și diverse amestecuri ale acestora. Vezi, de exemplu, Wallhausser, K.-H., Develop. Biol. Standard, 24:9-28 (1974) (S. Krager, Basel).

Compozițiile farmaceutice topice pot cuprinde, de asemenea, agenți de chelare adecvați pentru a forma complecși cu cationi metalici care nu traversează un strat dublu lipidic. Exemple de agenți de chelare adecvați includ acid etilen diamin tetraacetic (EDTA), acid etilen glicol-bis(beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacetic (EGTA) și acid 8-amino-2-[(2-amino-5-metilfenoxi)metil]-6-metoxichinolin-N,N,N',N'-tetraacetic, sare tetrapotasică (QUIN-2). Preferabil, agenții de chelare sunt EDTA și acid citric.

Compozițiile farmaceutice topice pot cuprinde, de asemenea, agenți de neutralizare adecvați utilizați pentru a ajusta pH-ul formulării într-un interval acceptabil farmaceutic. Exemple de agenți de neutralizare includ, dar nu se limitează la, trolamină, trometamina, hidroxid de sodiu, acid clorhidric, acid citric și acid acetic.

Compozițiile farmaceutice topice pot conține, de asemenea, agenți de creștere a vâscozității adecvați. Aceste componente sunt compuși difuzibili capabili să crească vâscozitatea unei soluții care conține polimer prin interacțiunea agentului cu polimerul. Carbopol Ultrez 10 poate fi utilizat ca agent de creștere a vâscozității.

Formele lichide, cum ar fi loțiunile adecvate pentru administrare topică, pot include un vehicul apos sau neapos adecvat cu tampoane, agenți de suspendare și distribuire, agenți de îngroșare, amplificatori de penetrare, și asemănător. Formele solide precum creme sau paste sau altele asemenea pot include, de exemplu, oricare dintre următoarele ingrediente, apă, ulei, alcool sau grăsime ca substrat cu surfactant, polimeri precum polietilen glicol, agenți de îngroșare, solide și asemănător. Formulările lichide sau solide pot include tehnologii de livrare îmbunătățite, cum ar fi lipozomi, microzomi, microbureți și asemănător. În plus, compușii pot fi eliberați utilizând un sistem cu eliberare susținută, cum ar fi matrici semipermeabile de polimeri hidrofobi solizi care conțin agentul terapeutic. Au fost stabilite diverse materiale cu eliberare susținută și sunt bine cunoscute de specialiștii în domeniu.

Atunci când este formulat pentru aplicare topică, compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, poate fi prezent între 0,1 și 50% în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,1 și 25 % în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,1 și 10 % în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,25 și 5 % în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,25 și 2 % în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,25 și 1 % în greutate. În unele exemple de realizare, compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent între 0,05 și 0,5% în greutate.

În unele exemple de realizare, compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este prezent la aproximativ 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 sau 10 % în greutate.

În unele exemple de realizare, compoziția farmaceutică care cuprinde compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, mai cuprinde unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari. În unele exemple de realizare, unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari sunt utili pentru a trata o boală autoimună a pielii. În unele exemple de realizare, unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari sunt utili pentru a trata o boală inflamatorie a pielii. În unele exemple de realizare, unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari sunt utili pentru tratarea dermatitei atopice. În unele exemple de realizare, unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari sunt utili pentru a trata alopecia areata. Clasa specifică de compuși sau compuși specifici care pot fi combinați cu compusul (I) într-o compoziție farmaceutică sunt exemplificate în paragrafele ulterioare.

Următoarele exemple nelimitative ilustrează compozițiile farmaceutice reprezentative ale prezentei invenții.

Formă de dozare comprimat oral solid

Compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este amestecat uscat cu celuloză microcristalină, polivinil pirolidonă și croscarmeloză de sodiu într-un raport de 4:5:1:1

și comprimat în tablete pentru a oferi o doză unitară, de exemplu, 5 mg, 20 mg sau 40 mg agent activ per comprimat.

Formă de dozare capsulă orală solidă

Compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este combinat cu celuloză microcristalină, polivinil pirolidonă și crosscarmeloză de sodiu într-un raport de 4:5:1:1 prin granulare umedă și încărcat în capsule de gelatină sau hidroxipropil metilceluloză pentru a furniza o doză unitară de, de exemplu, 5 mg, 20 mg sau 40 mg agent activ per capsulă.

Formulare lichidă

O formulare lichidă cuprinzând compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic (0,1 %), apă (98,9 %) și acid ascorbic (1,0 %) se formează prin adăugarea unui compus conform invenției, sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, la un amestec de apă și acid ascorbic.

Formă de dozare orală acoperită enteric

Compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, este dizolvat într-o soluție apoasă care conține polivinil pirolidonă și acoperit prin pulverizare pe microcristalină +celuloză sau granule de zahăr într-un raport de 1:5 g/g agent activ: granule și apoi o creștere de aproximativ 5 % în greutate a unei acoperiri enterice care cuprinde un copolimer acrilic, de exemplu o combinație de copolimeri acrilici disponibili sub denumirile comerciale Eudragit-L® și Eudragit-S®, sau succinat de acetat de hidroxipropil metilceluloză. Granulele acoperite enteric sunt încărcate în capsule de gelatină sau hidroxipropil metilceluloză pentru a furniza o unitate de dozare de, de exemplu, 30 mg de agent activ per capsulă.

Formă de dozare orală acoperită enteric

O acoperire enterică care cuprinde o combinație de Eudragit-L® și Eudragit-S® sau succinat de acetat de hidroxipropil metilceluloză este aplicată pe o formă de dozare comprimat oral sau o formă de dozare capsule orale descrisă mai sus.

Formulare de unguent pentru administrare topică

Compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este combinat cu petrolatum, trigliceridă C8-C10, octilhidroxistearat și N-metilpirolidonă într-un raport pentru a furniza o compoziție care conține 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare de unguent pentru administrare topică

Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este combinat cu petrolatum, trigliceridă C₈-C₁₀, octilhidroxistearat, alcool benzilic și N-metilpirolidonă într-un raport pentru a oferi o compoziție care conține 0,05 % până la 5 % din agent activ în greutate.

Formulare de unguent pentru administrare topică

Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este combinat cu petrolatum alb, propilen glicol, mono- și di-gliceride, parafină, hidroxitoluen butilat și edetat de calciu disodic într-un raport care să asigure o compoziție care conține 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare de unguent pentru administrare topică

Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic este combinat cu ulei mineral, parafină, carbonat de propilenă, vaselină albă și ceară albă pentru a furniza o compoziție care conține 0,05% până la 5% agent activ în greutate.

Formulare cremă pentru administrare topică

Uleiul mineral este combinat cu Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, propilen glicol, palmitat de izopropil, polisorbitat 60, alcool cetilic, monostearat de sorbitan, stearat de polioxil 40, acid sorbic, metilparaben și propil paraben pentru a forma o fază uleioasă, care este combinată cu apă purificată prin amestecare prin forfecare pentru a furniza o compoziție care conține 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare cremă pentru administrare topică

O formulare de cremă cuprinzând Compusul (I) sau sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, alcool benzilic, alcool cetilic, acid citric anhidru, mono și di-gliceride, alcool oleilic, propilen glicol, cetostearil sulfat de sodiu, hidroxid de sodiu, alcool stearilic, trigliceride și apă conțin 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare cremă pentru administrare topică

O formulare de cremă cuprinzând compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, alcool cetostearilic, miristat de izopropil, propilenglicol, cetomacrogol 1000, dimeticonă 360, acid citric, citrat de sodiu și apă purificată, cu imidurea, metilparabenul și propil parabenul, ca conservanți, conțin 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare cremă pentru administrare topică

O formulare de cremă care cuprinde Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, acid stearic, alcool cetostearilic, palmitat de izopropil, octilhidroxistearat, BRIJ S2

(PEG 2 Stearil Eter), BRIJ S20 (PEG 20 Stearil Eter).), N-Metilpirolidină, PEG și apă conține 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Formulare cremă pentru administrare topică

O formulare de cremă care cuprinde Compusul (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, acid stearic, alcool cetostearilic, palmitat de izopropil, octilhidroxistearat, BRIJ S2 (PEG 2 Stearil Eter), BRIJ S20 (PEG 20 Stearil Eter).), N-Metilpirolidină, PEG400 și apă conțin 0,05 % până la 5 % agent activ în greutate.

Utilitate

Compusul (I) s-a dovedit a fi un inhibitor puternic al familiei de enzime JAK: JAK1, JAK2, JAK3 și TYK2. Inhibarea familiei de enzime JAK ar putea inhiba semnalizarea multor citokine proinflamatorii cheie. Astfel, este de așteptat ca compusul (I) să fie util în tratamentul bolilor inflamatorii cum ar fi bolile inflamatorii gastrointestinale, bolile inflamatorii și pruriginoase ale pielii, bolile inflamatorii oculare și bolile respiratorii inflamatorii.

Boala inflamatorie a pielii

Dermatita atopică a fost asociată cu creșterea citokinelor proinflamatorii care se bazează pe calea JAK-STAT, în special IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 și IFN γ . Deoarece compusul (I) prezintă o inhibare puternică la toate cele patru enzime JAK, este de așteptat să inhibe puternic citokinele proinflamatorii caracteristice dermatitei atopice și altor boli inflamatorii ale pielii. Compusul (I) a arătat, de asemenea, aici că prezintă o valoare pIC₅₀ de 7,8 pentru inhibarea TARC indusă de TSLP în testul 4. Compusul (I) a prezentat o valoare pIC₅₀ de 8,5 pentru inhibarea fosforilării STAT6 induse de IL-13 în testele celulare descrise în Testul 2. Compusul (I) a prezentat, de asemenea, o valoare pIC₅₀ de 8,3 pentru inhibarea fosforilării STAT6 induse de IL-13 în cheratinocite epidermice umane normale în Testul 13. În plus, formulările model de cremă și unguent ale compusului (I) din Testul 6 au demonstrat semnificativ expunere a compusului în straturile epidermei și dermei la miniporci fără expunere detectabilă cu plasmă. Într-un test farmacodinamic ex vivo folosind pielea umană proaspăt excizată, s-a demonstrat că compusul (I) inhibă expresia genei CXCL10 și CCL2. Compusul (I) s-a arătat că prezintă o bună permeabilitate într-un test pe piele umană. Compusul (I) a inhibat, de asemenea, producția de pSTAT3 indusă de IL-31 cu 80% într-un model in vivo din Testul 9. În final, compusul (I) a prezentat un efect dependent de doză într-un model de dermatită de contact iritantă indusă de TPA la șoareci în testul 10.

S-a demonstrat, de asemenea, că compusul (I) prezintă o valoare pIC₅₀ de 8,4 pentru inhibarea fosforilării STAT5 induse de IL-2 în testele celulare descrise în Testul 11, o valoare pIC₅₀ de 7,2 pentru inhibarea fosforilării STAT4 induse de IL-12. În celulele T CD3+ umane din Testul 12, o valoare pIC₅₀ de 8,4 pentru inhibarea fosforilării STAT3 induse de IL-22 în cheratinocite epidermice umane normale în Testul 14. În cele din urmă, recuperarea compusului (I) pentru interleukina-22 (IL-22) a suprimat expresia filagrinei a fost observată la o concentrație < 1 μ M. IL-12, IL-22 și IL-23 sunt citokine implicate în psoriazis (Baliwag și colab., Cytokine, 2015, 73(2), 342-350 2015). Aceste citokine semnalizează prin enzimele JAK2 și Tyk2 (Ishizaki și colab., J. Immunol., 2011, 187, 181-189). Terapiile cu anticorpi care vizează aceste citokine au demonstrat utilitatea clinică în psoriazis (Schadler și colab., Disease-a-Month, 2018, 1-40). Un inhibitor topic de JAK care poate bloca aceste citokine ar fi de așteptat să fie eficient în această boală. Deoarece aceste citokine semnalizează prin Tyk2 și JAK2, este de așteptat ca compusul (I) să aibă activitate în această boală.

Este de așteptat ca nivelurile dermice susținute ale inhibitorilor JAK în absența unor niveluri sistemice semnificative să aibă ca rezultat o activitate antiinflamatoare și antipruriginică locală puternică în piele, fără efecte adverse determinate de sistem. Se așteaptă ca astfel de compuși să fie benefici într-un număr de afecțiuni inflamatorii sau pruriginoase dermice care includ, dar nu se limitează la, dermatită atopică, vitiligo, limfom cutanat cu celule T și subtipuri (sindromul Sezary, micoza fungoide, reticuloza pagetoidă, piele moale granulomatoasă, limfomatoză papuloză, pitiriazis lichenoid cronic, pitiriazis lichenoid și varioliformis acuta, limfom cutanat CD30+ cu celule T, limfom cutanat secundar CD30+ cu celule mari, fungoide non-micoză CD30- limfom cutanat cu celule T mari, limfom T pleomorf, limfom Lennert, limfom subcutanat cu celule T, limfom angiocentric, limfom blastoc cu celule NK), prurigo nodularis, lichen plan, dermatită de contact, eczemă dishidrotică, eczemă, dermatită numulară, dermatită seboreică, dermatită de stază, amiloidoză cutanată primară localizată, manifestări cutanate ale bolii grefă versus gazdă, pemfidozei. boala gazdei, pemfigoid, lupus discoid, granulom inelar, lichen simplex cronic, prurit, prurit vulvar/scrotal/perianal, lichen scleros, mâncărime post nevralgie herpetică, lichen planopilar, psoriazis și foliculită decalvană. În particular, dermatita atopică (Bao și colab., JAK-STAT, 2013, 2, e24137), alopecia areata (Xing și colab., Nat Med. 2014, 20, 1043-1049) care include subtipuri precum alopecia areata monolocularis, alopecia areata multilocularis, ophiasis, alopecia areata universalis, alopecia areata totalis și alopecia areata barbae, vitiligo (Craiglow și colab., JAMA Dermatol. 2015, 151, 1110-1112), limfom cutanat cu celule T (Netchiporouk și colab., Cell2014 Cycle. 13, 3331-3335), prurigo nodularis (Sonkoly și colab., J Allergy Clin Immunol. 2006, 117, 411-417), lichen plan (Welz-Kubiak și colab., J ImmunolRes. 2015, ID:8547), amiloidoză cutanată primară localizată (Tanaka și colab., Br J

Dermatol. 2009, 161, 1217-1224), pemfigoid bulos (Feliciani și colab., Int J Immunopathol Pharmacol. 1999, 12, 55-61) și manifestări dermice ale bolii grefă versus gazdă (Okiyama și colab., J Invest Dermatol. 2014, 134, 992-1000) sunt caracterizate prin creșterea anumitor citokine care semnalează prin activarea JAK. În consecință, compusul (I) poate fi capabil să atenueze inflamația dermică asociată sau pruritul determinat de aceste citokine. În particular, compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este de așteptat să fie util pentru tratamentul dermatitei atopice și a altor boli inflamatorii ale pielii.

Așa cum este ilustrat în Tabelul 13, s-a arătat că compusul (I) are clearance mare în microzomii umani. Ca atare, are avantajul de a fi eliminat rapid, ceea ce minimizează expunerea sistemică și reduce riscul de efecte adverse.

Așa cum este ilustrat în Tabelul 13, compusul (I) posedă de asemenea o permeabilitate ridicată, care este benefică pentru indicațiile pielii, deoarece pare a fi conectat cu o mai bună penetrare în piele.

Prin urmare, în unele exemple de realizare, invenția furnizează un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea unei boli inflamatorii sau autoimune a pielii la un mamifer (de exemplu, un om), cuprinzând aplicarea unei compoziții farmaceutice care cuprinde compusul (I) sau un sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și un purtător farmaceutic pentru pielea mamiferului.

În unele exemple de realizare, boala inflamatorie a pielii este dermatita atopică. În unele exemple de realizare, dermatita atopică este ușoară până la moderată. În unele exemple de realizare, dermatita atopică este moderată până la severă.

În unele exemple de realizare, boala autoimună a pielii este alopecia areata.

Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi de asemenea utilizat în combinație cu unul sau mai mulți compuși utili pentru tratarea bolilor inflamatorii ale pielii. În unele exemple de realizare, unul sau mai mulți compuși sunt un steroid, corticosteroid, antibiotic, antagonist al receptorului histamină H1, inhibitor al calcineurinei, antagonist IL-13, inhibitor PDE4, antagonist al receptorului 44 cuplat cu proteina G, antagonist IL-4, antagonistul receptorului al 5-HT 1a, antagonist al receptorului 5-HT 2b, agonist al receptorului alfa 2, antagonist al receptorului cannabinoid CB1, antagonistul receptorului cannabinoid CB1, chemokină CCR3, antagonist, inhibitor al collagenazei, inhibitor al fosfolipazei citosolice A2, , inhibitor al ligandului eotaxina, inhibitor al factorului de transcripție GATA 3, antagonist receptorului Histamina H4, antagonist IL-10, antagonist IL-12, antagonist IL-17, antagonist IL-2, antagonist IL-23, modulator al receptorului IL-4, antagonist IL-15, antagonist IL-6, antagonist IL-8, antagonist IL-9, antagonist IL-5, antagonist al imunoglobulinei E, modulator al imunoglobulinei E, inhibitor al receptorului eotaxină ligandistamină, inhibitor al factorului HATA 3 al transcripției HATA 3 antagonist IL-10, antagonist IL-12, antagonist IL-17, antagonist IL-2, antagonist IL-23, modulator al receptorului IL-4, antagonist IL-15, antagonist IL-6, antagonist IL-8, antagonist IL-9 , antagonist IL-5, antagonist al imunoglobulinei E, modulator al imunoglobulinei E, antagonist al receptorului interferon gama, ligand interferon gama, inhibitor al ligandului interleukinei 33, antagonist al receptorului interleukinei-31, antagonist al leucotrienelor, agonist al receptorului hepatic X, receptor beta agonist al receptorului hepatic X, inhibitor al factorului nuclear kapa B, antagonist al receptorului OX-40, antagonist PGD2, inhibitor al fosfolipazei A2, stimulator al inozitol fosfatazei 1 în domeniul SH2, inhibitor al ligandului limfoproteinei stromale timice, modulator TLR, modulator al ligandului alfa TNF, stimulator al genei TLR9, stimulator citotoxic al proteinei limfocitelor T-4, agonist al receptorului opioid kappa, inhibitor al galectin-3, inhibitor al histon deacetilază-1, inhibitor al histon deacetilază-2, inhibitor al histon deacetilază-3, inhibitor al histon deacetilază-6, inhibitor al histon deacetilază, agonist glucocorticoid, inhibitor al tirozin kinazei Syk, antagonist al receptorului TrkA, antagonist al integrinei alfa-4/beta-1, antagonist al receptorului interleukina 1, inhibitor al enzimei de conversie a interleukinei-1, antagonist al receptorului interleukina-31, inhibitor al genei KCNA din canalului de potasiu 3, inhibitor al genei PDE4B, Inhibitor al kalicreinei 2, agonist al receptorului-1 al sfingozin-1-fosfat, stimulator al proteinei epitelului pigmentar retinian, inhibitor al glicoproteinei CD28 de suprafață a celulelor T, antagonist beta TGF sau antagonist VR1 vaniloid.

În unele exemple de realizare, compusul (I) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat în combinație cu betametazonă, acid fucidic, GR-MD-02, dupilumab, acetat de rosiptor, AS-101, ciclosporină, IMD-0354, secukinumab, Actimmune, lebrikizumab, CMP-001, mepolizumab, pegcantratinib, tezepelumab, MM-36, crisaborol, ALX-101, bertilimumab, FB-825, AX-1602, BNZ-1, abatacept, tacrolimus, ANB-020, JTE-052, ZPL-389, ustekinumab, GBR-830, GSK-3772847, ASN-002, remetinostat, apremilast, timapiprant, MOR-106, asivatrep, nemolizumab, fevipiprant, doxiciclină, MDPK-67b, desloratadine, tralokinumab, fexofenadina, pimecrolimus, bepotastina, nalfurafina, VTP-38543, Q-301, ligelizumab, RVT-201, DMT-210, KPI-150, AKP-11, E-6005, AMG-0101, AVX-001, PG-102, ZPL-521, MEDI-9314, AM-1030, WOL-071007, MT-0814, valerat de betametazonă, SB-011, epinastina, tacrolimus, tranilast, sau viomed, sau orice combinație a acestora.

În unele exemple de realizare, compusul (I) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este administrat în combinație cu un steroid, un antibiotic și un hidratant (Lakhani și colab., Pediatric

Dermatology, 2017, 34, 3, 322-325). În unele exemple de realizări, unul sau mai mulți compuși sunt un antibiotic gram pozitiv, cum ar fi mupirocina sau acidul fusidic.

Compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, poate fi, de asemenea, utilizat în combinație cu antibiotice gram pozitive, cum ar fi mupirocina și acidul fusidic, pentru a trata bolile inflamatorii ale pielii. Într-un aspect, prin urmare, invenția furnizează o metodă de tratare a unei boli inflamatorii de piele la un mamifer, metoda cuprinzând aplicarea unui compus conform invenției, sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, și a unui antibiotic gram pozitiv pe pielea mamiferului. Într-un alt aspect, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus al invenției, sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, un antibiotic gram pozitiv și un purtător acceptabil farmaceutic.

Într-un alt aspect, așadar, invenția furnizează combinație terapeutică pentru utilizare în tratamentul afecțiunilor inflamatorii ale pielii, combinația cuprinzând compusul (I) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și unul sau mai mulți alți agenți terapeutici utili pentru tratarea tulburărilor inflamației pielii. Agenții secundari, atunci când sunt incluși, sunt prezenți într-o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic, adică în orice cantitate care produce un efect benefic din punct de vedere terapeutic atunci când este administrat concomitent cu compusul (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Prin urmare, este furnizată, de asemenea, o compoziție farmaceutică care cuprinde compusul (I) sau o sare farmaceutică a acestuia și unul sau mai mulți alți agenți terapeutici utili pentru tratarea tulburărilor inflamatorii ale pielii.

În plus, într-un aspect al metodei, invenția furnizează un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea afecțiunilor inflamatorii ale pielii, utilizarea cuprinzând administrarea la mamifer a Compusului (I) sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia, și a unuia sau a mai multor alți agenți terapeutici utili pentru tratarea afecțiunilor inflamatorii ale pielii.

Boală inflamatorie gastrointestinală

Datorită inhibării familiei de enzime JAK, este de așteptat ca compusul (I) să fie util pentru o varietate de indicații inflamatorii gastrointestinale care includ, dar nu se limitează la, colita ulcerosă (proctosigmoidita, pancolită, proctită ulcerativă, colita lateral stângă), boala Crohn, colita colagenă, colita limfocitară, boala Behcet, boala celiacă, colita indusă de inhibitori ai punctelor de control imun, ileita, esofagită eozinofilă, colita legată de boala grefă versus gazdă și colita infecțioasă. Colita ulcerativă (Reimund și colab., J Clin Immunology, 1996, 16, 144-150), boala Crohn (Woywodt și colab., Eur J Gastroenterology Hepatology, 1999, 11, 267-276), colita colagenoasă (Kumawat și colab., Mol Immunology, 2013, 55, 355-364), colita limfocitară (Kumawat și colab., 2013), esofagita eozinofilă (Weinbrand-Goichberg și colab., Immunol Res, 2013, 56, 249-260), colita asociată bolii grefă versus gazdă (Coghill și colab., Blood, 2001, 117, 3268-3276), colita infecțioasă (Stallmach și colab., Int J Colorectal Dis, 2004, 19, 308-315), boala Behcet (Zhou și colab., Autoimmun Rev, 2012, 11, 699-704), boala celiacă (de Nitto și colab., World J Gastroenterol, 2009, 15, 4609-4614), colită indusă de inhibitor al punctului de control imun (de exemplu, colită indusă de inhibitor CTLA-4); (Yano și colab., J Translation Med, 2014, 12, 191), colita indusă de inhibitori PD-1 sau PD-L1 și ileita (Yamamoto și colab., Dig Liver Dis, 2008, 40, 253-259) sunt caracterizate prin creșterea anumitor niveluri de citokine proinflamatorii. Deoarece multe citokine proinflamatorii semnalează prin activarea JAK, compușii descriși în această cerere pot fi capabili să atenueze inflamația și să ofere ameliorarea simptomelor.

Prin urmare, în unele exemple de realizare, dezvoltarea furnizează un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea unei boli inflamatorii gastrointestinale la un mamifer (de exemplu, un om), cuprinzând administrarea la mamifer a unei compoziții farmaceutice care cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic și un compus (I) sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

În unele exemple de realizare, dezvoltarea furnizează un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea unei boli inflamatorii gastrointestinale la un mamifer (de exemplu, un om), cuprinzând administrarea compusului (I) la mamifer sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic.

Invenția furnizează în plus un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea colitei ulcerose la un mamifer, metoda cuprinzând administrarea la mamifer a unui compus conform invenției, sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic și un compus al invenției, sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Când este utilizat pentru a trata colita ulcerosă, compusul conform invenției va fi administrat în mod tipic oral într-o singură doză zilnică sau în doze multiple zilnice, deși pot fi utilizate alte forme de administrare. Cantitatea de agent activ administrată per doză sau cantitatea totală administrată pe zi va fi determinată în mod obișnuit de către un medic, în lumina circumstanțelor relevante, inclusiv a afecțiunii care trebuie tratată, calea de administrare aleasă, compusul administrat efectiv și activitatea relativă a acestuia, vârsta, greutatea și răspunsul individual al pacientului, severitatea simptomelor pacientului și asemănător.

Se așteaptă ca dozele adecvate pentru tratarea colitei ulcerative și a altor afecțiuni inflamatorii gastrointestinale să varieze de la aproximativ 1 la aproximativ 400 mg/zi de agent activ, inclusiv de la aproximativ 5 la aproximativ 300 mg/zi și de la aproximativ 20 la aproximativ 70 mg per zi de agent activ pentru un om mediu de 70 kg.

Compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, poate fi, de asemenea, utilizat în combinație cu unul sau mai mulți agenți care acționează prin același mecanism sau prin mecanisme diferite pentru a efectua tratamentul tulburărilor inflamatorii gastrointestinale. Clasele utile de agenți pentru terapia combinată includ, dar nu se limitează la, aminosalicilați, steroizi, imunosupresoare sistemice, anticorpi anti-TNF α , anticorpi anti-VLA-4, anticorpi anti-integrină $\alpha 4\beta 7$, agenți antibacterieni și medicamente anti-diareice.

Aminosalicilați care pot fi utilizați în combinație cu compusul (I) includ, dar nu sunt limitați la, mesalamină, osalazină și sulfasalazină. Exemplele de steroizi includ, dar nu se limitează la, prednison, prednisolon, hidro cortizon, budesonid, beclometazonă și fluticazonă. Imunosupresoarele sistemice utile pentru tratamentul tulburărilor inflamatorii includ, dar nu se limitează la, ciclosporină, azatioprină, metotrexat, 6-mercaptopurină și tacrolimus. Mai mult, anticorpii anti-TNF α , care includ, dar nu se limitează la, infliximab, adalimumab, golimumab și certolizumab, pot fi utilizați în terapia combinată. Compușii utili care acționează prin alte mecanisme includ anticorpi anti-VLA-4, cum ar fi natalizumab, anticorpi anti-integrină $\alpha 4\beta 7$, cum ar fi vedolizumab, agenți anti-bacterieni, cum ar fi rifaximina și medicamente anti-diareice, cum ar fi loperamida. (Mozaffari et al. Expert Opin. Biol. Ther. 2014, 14, 583-600; Danese, Gut, 2012, 61, 918-932; Lam și colab., Immunotherapy, 2014, 6, 963-971).

Într-un alt aspect, așadar, invenția furnizează o combinație terapeutică pentru utilizare în tratamentul afecțiunilor inflamatorii gastrointestinale, combinația cuprinzând un compus al invenției, sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și unul sau mai mulți alți agenți terapeutici utili pentru tratarea tulburărilor inflamatorii gastrointestinale. De exemplu, invenția furnizează o combinație cuprinzând un compus al invenției, sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, și unul sau mai mulți agenți selectați dintre aminosalicilați, steroizi, imunosupresoare sistemice, anticorpi anti-TNF α , anticorpi anti-VLA-4, anticorpi anti-integrină $\alpha 4\beta 7$, agenți antibacterieni și medicamente anti-diareice. Agentul/Agenții secundari, atunci când este/sunt incluși, sunt prezenți într-o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic, adică în orice cantitate care produce un efect benefic din punct de vedere terapeutic atunci când este co-administrat cu un compus al invenției, sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

De asemenea, este furnizată, prin urmare, o compoziție farmaceutică cuprinzând compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și unul sau mai mulți alți agenți terapeutici utili pentru tratarea tulburărilor inflamatorii gastrointestinale.

Afecțiuni respiratorii

Citokine care semnalizează prin calea JAK-STAT, în special IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-23, IL-31, IL-27, limfopoietina stromală timică (TSLP), interferon- γ (IFN γ) și factorul de stimulare a coloniilor granulocite-macrofage (GM-CSF) au fost implicate în inflamația astmului și în alte boli respiratorii inflamatorii. Așa cum s-a descris mai sus, s-a demonstrat că Compusul (I) este un inhibitor puternic al kinazelor JAK și a demonstrat o inhibare puternică a citokinelor proinflamatorii IL-13 în testele celulare.

Activitatea antiinflamatoare a inhibitorilor JAK a fost puternic demonstrată în modelele preclinice de astm bronșic (Malaviya și colab., Int Immunopharmacol, 2010, 10, 829-836; Matsunaga și colab., Biochem și Biophys Res Commun, 2011), 404, 261-267; Kudlacz și colab., Eur J Pharmacol, 2008, 582, 154-161.) În consecință, compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic, poate fi utilă pentru tratamentul tulburărilor respiratorii inflamatorii precum astmul. Inflamația și fibroza plămânului sunt caracteristice altor boli respiratorii, în plus față de astm, cum ar fi boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC), fibroza chistică (FC), pneumonia, bolile pulmonare interstițiale (inclusiv fibroza pulmonară idiopatică), leziunea pulmonară acută, leziunea respiratorie acută, sindrom de detresă respiratorie acută, bronșită, emfizem și bronșiolită obliterantă. Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, prin urmare, poate fi util pentru tratamentul bolii pulmonare obstructive cronice, fibrozei chistice, pneumoniei, bolilor pulmonare interstițiale (inclusiv fibroza pulmonară idiopatică), leziunii pulmonare acute, sindromului de detresă respiratorie acută, bronșitei, emfizemului, bronșiolitei obliterante, disfuncției cronice de alogrefă pulmonară (CLAD), respingerii transplantului pulmonar și sarcoidozei.

Într-un aspect, prin urmare, dezvăluirea furnizează o metodă de tratare a unei boli respiratorii la un mamifer (de exemplu, un om) cuprinzând administrarea la mamifer de compus (I), sau sarea acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Într-un aspect, boala respiratorie este astmul, boala pulmonară obstructivă cronică, fibroza chistică, pneumonita, boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC), fibroza chistică (FC), pneumonita, bolile pulmonare interstițiale (inclusiv fibroza pulmonară idiopatică), leziune pulmonară acută, sindrom

de detresă respiratorie acută, bronșită, emfizem, bronșiolită obliterantă, rinită alergică sau sarcoidoză. Într-un alt aspect, boala respiratorie este astmul sau boala pulmonară obstructivă cronică.

Într-un alt aspect, boala respiratorie este o infecție pulmonară, o infecție helmintică, hipertensiune arterială pulmonară, sarcoidoză, limfangioleiomiomatoză, bronșiectazie sau o boală pulmonară infiltrativă. În încă un alt aspect, boala respiratorie este pneumonita indusă de medicamente, pneumonia indusă fungic, aspergiloza bronhopulmonară alergică, pneumonia de hipersensibilitate, granulomatoza eozinofilă cu poliangită, pneumonia eozinofilă acută idiopatică, pneumonia eozinofilă cronică idiopatică, sindromul hipereozinofilic, sindromul Löfller, bronșiolită obliterantă cu pneumonie organizatoare sau pneumonită indusă de un inhibitor imun al punctului de control.

Invenția furnizează în plus un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea unei boli respiratorii, metoda cuprinzând administrarea la mamifer a unei compoziții farmaceutice cuprinzând compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și un purtător acceptabil farmaceutic.

Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi, de asemenea, utilizat în combinație cu unul sau mai mulți compuși utili pentru bolile respiratorii.

Boli oculare

Multe boli oculare au fost asociate cu creșteri ale citokinelor proinflamatorii care se bazează pe calea JAK-STAT.

Prin urmare, compusul (I) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia poate fi util pentru tratamentul unui număr de boli oculare care includ, dar nu se limitează la, uveită, retinopatie diabetică, edem macular diabetic, boala ochiului uscat, degenerescenta maculară legată de vârstă și keratoconjunctivita atopică.

În particular, uveită (Horai și Caspi, J Interferon Cytokine Res, 2011, 31, 733-744), retinopatie diabetică (Abcouwer, J Clin Cell Immunol, 2013, Suppl 1, 1-12), edem macular diabetic (Sohn și colab., American Journal of Ophthalmology, 2011, 152, 686-694), boala ochiului uscat (Stevenson și colab., Arch Ophthalmol, 2012, 130, 90-100), ocluzia venei retiniene (Shchuko și colab., Indian Journal of Ophthalmology, 2015, 63(12), 905-911) și degenerescenta maculară legată de vârstă (Knickerbein și colab., Int Ophthalmol Clin, 2015, 55(3), 63-78) sunt caracterizate prin creșterea anumitor citokine proinflamatorii care sunt semnalizate prin calea JAK-STAT. În consecință, compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi capabil să atenueze inflamația oculară asociată și să inverseze progresia bolii sau să ofere ameliorarea simptomelor.

Într-un aspect, prin urmare, invenția furnizează un compus cu formula (I) pentru utilizare în tratarea unei boli oculare la un mamifer cuprinzând administrarea compusului (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic sau a unei compoziții farmaceutice care cuprinde compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și un purtător farmaceutic la ochiul mamiferului. Într-un aspect, boala oculară este uveita, retinopatia diabetică, edemul macular diabetic, boala ochiului uscat, degenerescenta maculară legată de vârstă, sau keratoconjunctivita atopică. Într-un aspect, metoda cuprinde administrarea compusului (I) sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia prin injectare intravitreală.

Compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic, poate fi de asemenea utilizat în combinație cu unul sau mai mulți compuși utili pentru bolile oculare.

Alte boli

Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi, de asemenea, util pentru tratarea altor boli, cum ar fi alte boli inflamatorii, boli autoimune sau cancer.

Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi util pentru tratarea cavităților bucale, a mucozitei bucale și a stomatitei aftoase recurente.

Compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi util pentru a trata una sau mai multe dintre artrita, artrita reumatoidă, artrita reumatoidă juvenilă, respingerea transplantului, xeroftalmia, artrita psoriazică, diabetul, diabetul dependent de insulină, boala neuronului motor, sindrom mielodisplazic, durere, sarcopenie, cașexie, șoc septic, lupus eritematos sistemic, leucemie, leucemie limfocitară cronică, leucemie mielocitară cronică, leucemie limfoblastică acută, leucemie mielogenă acută, spondilită anchilozantă, mielofibroză, limfom cu celule B, carcinoma hepatocelular, boala Hodgkins, cancer de sân, mielom multiplu, melanom, limfom non-Hodgkin, cancer de plămân cu celule non-mici, carcinom ovarian cu celule clare, tumoră ovariană, tumoră pancreasului, policitemie vera, sindrom Sjogrens, sarcom de țesut moale, sarcom, splenomegalie, limfom cu celule T și talasemie majoră.

Dezvăluirea furnizează o astfel de metodă de tratare a acestor boli la un mamifer care cuprinde administrarea compusului (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic sau o compoziție farmaceutică care cuprinde compusul (I), sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic și un purtător acceptabil farmaceutic la mamifer.

În paragrafele anterioare, atunci când sunt utilizați în terapia combinată, agenții pot fi formulați într-o singură compoziție farmaceutică, așa cum s-a dezvăluit mai sus, sau agenții pot fi furnizați în compoziții separate care sunt administrate simultan sau la momente separate, în timp prin aceeași sau prin diferite căi de administrare. Când sunt administrați separat, agenții sunt administrați suficient de aproape în timp pentru a asigura efectul terapeutic dorit. Astfel de compoziții pot fi ambalate separat sau pot fi ambalate împreună ca un kit. Cei doi sau mai mulți agenți terapeutici din kit pot fi administrați pe aceeași cale de administrare sau pe căi diferite de administrare.

EXAMPLE

Următoarele exemple sintetice și biologice sunt oferite pentru a ilustra invenția și nu trebuie interpretate în niciun fel ca limitând domeniul de aplicare al invenției. În exemplele de mai jos, următoarele abrevieri au următoarele semnificații, dacă nu se indică altfel. Abrevierile care nu sunt definite mai jos au semnificațiile lor general acceptate.

ACN = acetonitril

Bn = benzil

Boc = tert-Butil oxycarbonil

d = zi(zile)

DIPEA = N,N-diizopropil etilamina

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetil sulfoxid

EtOAc = acetat de etil

EtOH = alcool etilic

h = oră(ore)

HATU = hexafluorofosfat de N,N,N',N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uroniu

IPA = alcool izopropilic

MeOH = metanol

min = minut(minute)

NMP = N-metilpirolidona

RT = temperatura camerei

TEA = trietilamina

THF = tetrahidrofuran

TFA = acid trifluoroacetic

Reactivii și solvenții au fost achiziționați de la furnizori comerciali (Aldrich, Fluka, Sigma etc.) și utilizați fără purificare suplimentară. Progresul amestecurilor de reacție a fost monitorizat prin cromatografie în strat subțire (TLC), cromatografie lichidă analitică de înaltă performanță (anal. HPLC) și/sau spectrometrie de masă. Amestecuri de reacție au fost prelucrate așa cum este descris în mod specific în fiecare reacție; în mod obișnuit, acestea au fost purificate prin extracție și alte metode de purificare, cum ar fi cristalizarea și precipitarea dependentă de temperatură și solvent. În plus, amestecurile de reacție au fost purificate în mod obișnuit prin cromatografie pe coloană sau prin HPLC preparativă, utilizând în mod obișnuit coloane C18 sau BDS împachetate și eluanți convenționali. Condițiile HPLC preparative tipice sunt descrise mai jos.

Caracterizarea produsilor de reacție a fost efectuată în mod obișnuit prin spectrometrie de masă și ¹H-RMN. Pentru analiza RMN, probele au fost dizolvate în solvent deuterat (cum ar fi CD₃OD, CDCl₃, sau d₆-DMSO), și spectrele ¹H-RMN au fost obținute cu un instrument Varian Gemini 2000 (400 MHz) în condiții standard de observare. Identificarea spectrometrică de masă a compușilor a fost efectuată printr-o metodă de ionizare prin electrospray (ESMS) cu un instrument Applied Biosystems (Foster City, CA) model API 150 EX sau un instrument Waters (Milford, MA) 3100, cuplat la sisteme de autopurificare.

Dacă nu se indică altfel, s-au folosit următoarele condiții pentru purificări HPLC preparativă.

Coloană:	C18, 5 μm 21.2 × 150 mm sau C18, 5 μm 21 × 250 mm sau
	C14, 5 μm 21×150 mm
Temperatura coloanei:	Temperatura camerei
Viteză de curgere	20,0 mL/min
Faza mobilă:	A = apă + 0,05 % TFA
	B = ACN + 0,05 % TFA,
Volumul injecției:	(100-1500 μL)
Lungimea de undă a detectorului:	214 nm

Compușii bruti au fost dizolvați în apă:acid acetic 1:1 la aproximativ 50 mg/mL. A fost efectuată o rulare de testare la scară analitică de 4 minute utilizând o coloană C18 de $2,1 \times 50$ mm urmată de o rulare la scară preparativă de 15 sau 20 de minute folosind injecție de 100 μ L cu gradient bazat pe retenția % B a testului la scară analitică. Gradientii exacti au fost dependenți de eșantion. Probele cu impurități cu timpi de eluare apropiați au fost verificate cu o coloană C18 de 21×250 mm și/sau o coloană C14 de 21×150 mm pentru o separare optimă. Frațiile care conțin produsul dorit au fost identificate prin analiză spectrometrică de masă.

Condițiile analizei HPLC**Metoda A**

Coloană:	LUNA C18 (2), 150×4.60 mm, 3 μ m
Temperatura coloanei:	37 °C
Viteza de curgere:	1,0 mL/min
Volumul injecției:	5 μ L
Prepararea probei:	Dizolvat în 1:1 ACN:apă
Faza mobilă:	A = Apă:ACN:TFA (98:2:0.05)
	B = Apă:ACN:TFA (2:98:0.05)
Lungimea de unda a detectorului:	250 nm
Gradient:	32 min total (timp (min)/ % B): 0/2, 10/20, 24/90, 29/90, 30/2, 32/2

Metoda B

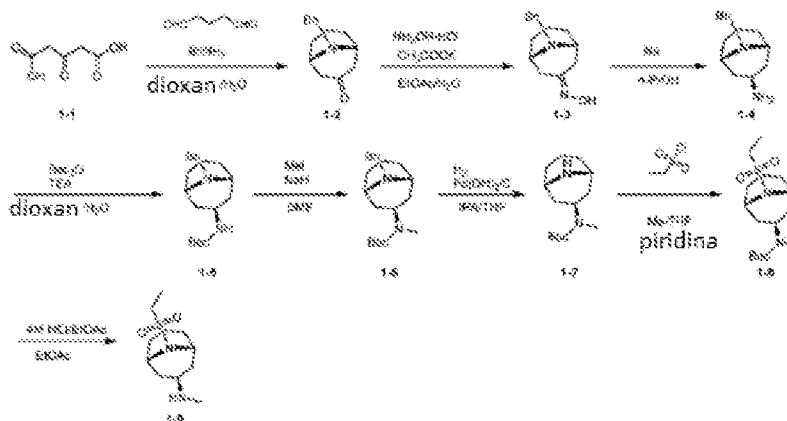
Coloană:	LUNA C18 (2), 150×4.60 mm, 3 μ m
Temperatura coloanei:	37 °C
Viteza de curgere:	1,0 mL/min
Volumul injecției:	10 μ L
Prepararea probei:	Dizolvat în 1:1 ACN:apă
Faza mobilă:	A = Apă:ACN:TFA (98:2:0.05)
	B = Apă: ACN:TFA (10:90:0.05)
Lungimea de unda a detectorului:	254 nm
Gradient:	35 min total (timp (min)/ % B): 0/2, 20/25, 23/90, 26/90, 27/2, 35/2

Metoda C

Coloană:	Poroshell 120 SB-Aq, 150mm pe 4,6mm, 2,7 micron parte
#683975-914	
Temperatura coloanei:	35 °C
Viteza de curgere:	1,0 mL/min
Volumul injecției:	5 μ L
Prepararea probei:	Dizolvat în 50:MPB:50MPA
Faza mobilă:	A = Acetonitril:apă: acid Trifluoroacetic (1:99:0.20)
	B = Acetonitril:apă: acid Trifluoroacetic (90:10:0.20)

Gradient:

Timp, min	%A	%B
0,0	98,0	2,0
16,0	40,0	60,0
22,0	0,0	100,0
25,0	0,0	100,0
25,1	98,0	2,0
30,0	98,0	2,0

Preparatul 1: ((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)-carbamat de tert-butil

Etapă 1: Cinci reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus 1-1 (2,00 kg, 13,7 mol, 1,00 echiv.) în dioxan (5,00 L) și apă (20,0 L) s-a adăugat glutaraldehidă (2,06 kg, 20,5 mol, 1,5 echiv.) și fenilmetanamină (1,54 kg, 14,4 mol, 1,05 echiv.) prin picurare la 10 °C. După adăugare, amestecul de reacție a fost agitat la 20°C timp de 16 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 5 : 1, produs R_f = 0,40) și LCMS au indicat că reacția a fost completă. Valoarea pH-ului amestecului de reacție a fost ajustată la 2 cu HCl concentrat (12 N) la 20°C. După adăugare, amestecul de reacție a fost încălzit la 60 °C și agitat timp de 1 oră. După răcire la 10°C, la amestec s-a adăugat acetat de etil (10,0 L). Apoi valoarea pH-ului amestecului a fost ajustată la 10 prin adăugarea unei soluții apoase de hidroxid de sodiu (12 N) la 10 °C. Amestecul a fost agitat timp de 10 min. Stratul organic a fost separat. Stratul apos a fost extras cu acetat de etil (3,00 L). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (4,00 L), uscate pe sulfat de sodiu și filtrate. Stratul organic pentru cele cinci reacții paralele a fost combinat și concentrat. Reziduu a fost purificat prin cromatografie coloană (SiO₂, eter de petrol : acetat de etil = 30 : 1 - 2 : 1) pentru a da compusul **1-2** (10,0 kg, 51,5% randament, 97% puritate). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₅H₁₉NO 230,15 găsit 230,0. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ δ 7,24-7,41 (m, 5H), 3,88 (s, 2H), 3,20-3,21 (m, 2H), 2,73-2,79 (m, 2H), 2,07 (d, J = 16,4 Hz, 2H), 1,75-1,84 (m, 2H), 1,45-1,50 (m, 3H), 1,24-1,36 (m, 1H).

Etapă 2: Au fost efectuate trei reacții în paralel. La o soluție de compus **1-2** (3,00 kg, 13,1 mol, 1,0 echiv.) în acetat de etil (24,0 L) și apă (9,00 L) s-a adăugat CH₃COOK (2,05 kg, 20,9 mol, 1,6 echiv.) și NH₂OH-HCl (1,82 kg, 26,2 mol, 2,0 echiv.) la 20 °C. Suspensia a fost încălzită la 45°C și agitată timp de 16 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 2 : 1, produs R_f = 0,30) și LCMS au indicat că reacția a fost completă. Valoarea pH-ului suspensiei a fost ajustată la 8 cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu, apoi a fost diluată cu apă (15,0 L) și acetat de etil (10,0 L). Stratul organic a fost separat. Stratul apos a fost extras cu acetat de etil (10,0 L × 3). Stratul organic a celor trei reacții a fost combinat, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat. Produsul brut a fost diluat cu n-heptan (12,0 L) și agitat timp de 12 ore. Solidul a fost colectat prin filtrare pentru a da compusul **1-3** (8,00 kg, randament 83,4%). (m/z): [M+H]⁺ calculat pentru C₁₅H₂₀N₂O 245,16 găsit 245,1. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 10,16 (s, 1H), 7,22-7,38 (m, 5H), 3,83 (s, 2H), 2,97 (br s, 2H), 2,87 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 2,60-2,62 (m, 1 H), 2,20-2,25 (m, 1 H), 2,09-2,13 (m, 1 H), 1,72-1,85 (m, 3H), 1,39-1,49 (m, 3H).

Etapă 4: Patruzeci și cinci de reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus **1-3** (160 g, 655 mmol, 1,0 echiv.) în n-PrOH (3,20 L) la 110 °C s-a adăugat Na (181 g, 7,86 mol, 12 echiv.) în porții timp de 3 ore. Amestecul a fost agitat la 110 °C timp de 2 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 2 : 1, SM R_f = 0,40) a indicat că reacția a fost completă. Amestecul a fost răcit la 70 °C, turnat în apă cu

gheață (4,00 L). Stratul apos a fost extras cu acetat de etil (1,00 L × 2). Stratul organic combinat al celor patruzeci și cinci de reacții a fost spălat cu saramură (20,0 L), uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat. Reziduul a fost diluat cu n-hexan (12,0 L), agitat timp de 12 ore. Suspensia a fost filtrată pentru a obține filtrat. Filtratul a fost concentrat pentru a da compusul **1-4** (6,00 kg, 88,4% randament) sub formă de ulei galben. ¹H RMN 400 MHz DMSO-d₆: 5 7,18-7,35 (m, 5H), 3,76 (s, 2H), 3,26-3,35 (m, 1H), 2,76 (s, 2H), 1,86-1,90 (m, 2H), 1,67-1,73 (m, 2H), 1,54-1,59 (m, 5H), 1,41-1,45 (m, 3H).

Etapa 5: Două reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus **1-4** (2,10 kg, 9,12 mol, 1,1 echiv.) în dioxan (12,6 L) și apă (1,26 L) s-a adăugat Et₃N (1,01 kg, 10,0 mol, 1,1 echiv.) și (Boc)₂O (2,19) kg, 10,0 mol, 1,1 echiv.) prin picurare la 0 °C, cu temperatura sub 20 °C. Amestecul a fost încălzit la 40°C și agitat timp de 10 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 2 : 1, produs R_f = 0,40) a arătat că reacția a fost completă. Amestecul a fost răcit la 10 °C, filtrat pentru a obține turtă de filtrare. Filtratul a fost concentrat. Turta de filtrare a fost spălată cu n-hexan (3,00 L) pentru a da compusul **1-5** (4,00 kg, randament 66,4%) ca un solid alb. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆: 5 7,28-7,33 (m, 4H), 7,19-7,22 (m, 1H), 6,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,10-4,17 (m, 1H), 3,77 (s, 2H), 2,77 (s, 2H), 1,88-1,90 (m, 2H), 1,72-1,75 (m, 3H), 1,57-1,61 (m, 3H), 1,43-1,48 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

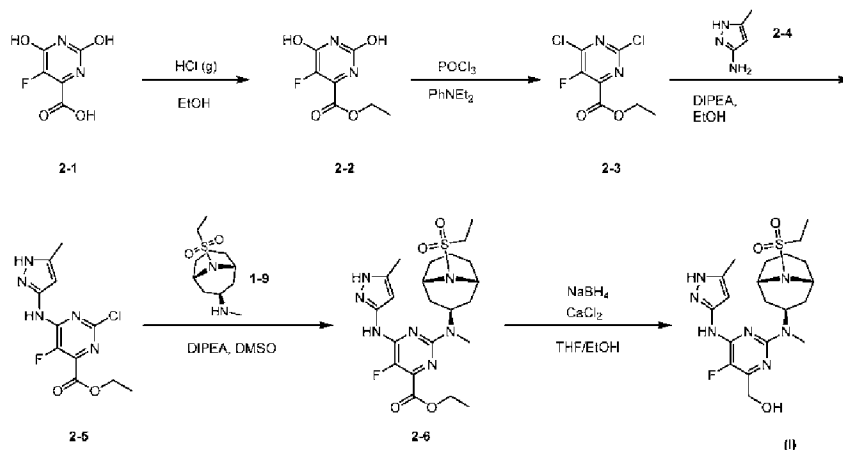
Etapa 6: Patru reacții au fost efectuate în paralel. La o suspensie de compus **1-5** (1,50 kg, 4,54 mol, 1,0 echiv.) în DMF (13,5 L) s-a adăugat NaH (272 g, 6,81 moli, puritate 60%, 1,5 echiv.) în porțiuni la 0°C sub N₂. Suspensia a fost încălzită în mod natural la 25 °C și agitată timp de 30 de minute. După ce s-a răcit la 0°C, Mel (773 g, 5,45 mol, 1,2 echiv.) a fost adăugat în picătură la suspensie. Amestecul de reacție a fost încălzit în mod natural la 25 °C și agitat timp de 12 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 5 : 1, produs R_f = 0,50) și LCMS au arătat că reacția a fost completă. Amestecul a fost turnat în apă cu gheață (30,0 L), extras cu acetat de etil (9,00 L, 3,00 L). Stratul organic combinat al celor patru reacții a fost spălat cu apă cu gheață (20,0 L), saramură (10,0 L), uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat pentru a da compusul **1-6** (6,00 kg, brut) sub forma unui ulei galben. Produsul brut a fost utilizat pentru etapa următoare. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 7,21-7,37 (m, 5H), 4,87 (br s, 1 H), 3,80 (s, 2H), 2,86 (s, 2H), 2,68 (s, 3H), 1,64-1,99 (m, 6H), 1,40-1,49 (m, 13H). (m/z): [M+H]⁺ calculat pentru C₂₁H₃₂N₂O₂ 344,25 găsit 345,2.

Etapa 7: Treizeci și nouă de reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus **1-6** (150 g, 435 mmol, 1,0 echiv.) în IPA (500 mL) și THF (500 mL) s-a adăugat Pd(OH)₂/C (70 g, puritate 40%). Suspensia a fost degazată sub vid și purjată cu H₂ de mai multe ori. Amestecul a fost agitat sub H₂ (50 psi) la 25°C timp de 16 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 5 : 1, SM R_f = 0,50) și LCMS au indicat că reacția a fost completă. Cele treizeci și nouă de reacții au fost combinate. Amestecul a fost filtrat pentru a obține filtrat. Turta de filtru a fost spălată cu IPA/THF (1:1, 25,0 L). Filtratul combinat a fost concentrat pentru a da compusul **1-7** (3,85 kg, brut) sub forma unui ulei galben deschis. Produsul brut a fost utilizat direct pentru etapa următoare. (m/z): [M+H]⁺ calculat pentru C₁₄H₂₆N₂O₂ 255,20 găsit 255,1. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 4,88 (br s, 1 H), 3,08 (s, 2H), 2,60 (s, 3H), 1,73-1,76 (m, 5H), 1,51-1,61 (m, 5H), 1,39 (s, 9H).

Etapa 8: Patru reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus **1-7** (750 g, 2,95 mol, 1,0 echiv.) în 2-metil tetrahidrofuran (3,00 L) s-a adăugat piridină (466 g, 5,90 mol, 2,0 echiv.) și clorură de etansulfonil (398 g, 3,10 mol, 1,05 echiv.) prin picurare la 0 °C sub N₂. Amestecul a fost încălzit la 25°C și agitat timp de 3 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 2 : 1, produs R_f = 0,50) a indicat că reacția a fost completă. Cele patru reacții au fost combinate. Amestecul a fost stins cu apă cu gheață (10,0 L). Stratul organic a fost separat, spălat cu HCl 0,5 N (3,00 L x 2). Stratul apos combinat a fost extras cu acetat de etil (3,00 L), stratul organic a fost spălat din nou cu HCl 0,5 N (500 ml). Stratul organic combinat a fost spălat cu saramură (5,00 L), uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat pentru a da compusul **1-8** (2,20 kg, brut) sub forma unui ulei galben. Produsul brut a fost utilizat în etapa următoare. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 4,94 (br s, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,10 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (s, 3H), 1,83-1,91 (m, 5H), 1,56-1,71 (m, 5H), 1,40 (s, 9H), 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 9: Patru reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus **1-8** (550 g, 1,59 mol, 1,0 echiv.) în EtOAc (2,75 L) s-a adăugat HCl/EtOAc (4 M, 3,0 echiv.) prin picurare la 25°C. Amestecul a fost agitat la 25°C timp de 12 ore. TLC (eter de petrol : acetat de etil = 2 : 1, SM R_f = 0,50) a arătat că reacția a fost completă. Cele patru reacții au fost combinate. Amestecul a fost filtrat pentru a obține turta de filtrare pentru a da compusul **1-9** (1,25 kg, brut, HCl) ca un solid galben. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 9,04 (s, 1 H), 4,02 (s, 2H), 3,88-3,94 (m, 1 H), 3,09 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,09-2,14 (m, 2H), 1,61-1,84 (m, 8H), 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Preparat 2: (2-(((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)-amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (I)



Etapa 1: O soluție de compus 2-1 (1,00 kg, 5,74 mol, 1,0 echiv.) în etanol (15,0 L) cu HCl saturat (1,40 kg, 38,4 mol) a fost agitată la 90 °C timp de 60 ore. HPLC a arătat că a fost detectat un vârf principal. Amestecul de reacție a fost filtrat. Turta de filtrare a fost colectată pentru a da compusul 2-2 (1,00 kg, randament 81,8%, puritate 98,8%) ca un solid alb. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 11,82 (br s, 1 H), 10,82 (brs, 1 H), 4,31 (q, J = 7,2 Hz, 2 H), 1,27 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

Etapa 2: Cinci reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus 2-2 (560 g, 2,77 mol, 1,0 echiv.) în POCl₃ (1,68 L) s-a adăugat N,N-dietilanilină (289 g, 1,94 mol, 0,7 echiv). Amestecul a fost agitat la 140°C timp de 12 ore. TLC (eter de petrol: acetat de etil = 10 : 1, produs R_f = 0,50) a indicat că compusul 2-2 a fost consumat complet. Cele cinci reacții au fost combinate. Amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Reziduul a fost diluat cu acetat de etil (25,0 L). Soluția a fost turnată în gheață pisată (25,0 L). Faza apoasă a fost extrasă cu acetat de etil (25,0 L). Straturile organice combinate au fost spălate cu soluție saturată de carbonat de sodiu (10,0 L x 2), uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Reziduul a fost purificat prin cromatografie coloană (SiO₂, eter de petrol: acetat de etil = 1 : 0 - 50 : 1) pentru a da compusul 2-3 (2,00 kg) ca un lichid maro. ¹H RMN: 400 MHz CDCl₃ 5 4,51 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 1,44 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 3: Patru reacții au fost efectuate în paralel. Un amestec de compus 2-3 (480 g, 2,01 mol, 1,0 echiv), compus 2-4 (224 g, 2,31 mol, 1,15 echiv), DIPEA (519 g, 4,02 mol, 2,0 echiv) în etanol (2,60 L) a fost degazat și purjat cu N₂ de 3 ori și apoi amestecul a fost agitat la 25 °C timp de 4 ore sub atmosferă de N₂. TLC (eter de petrol: acetat de etil = 10:1) a indicat că compusul 2-3 a fost consumat complet. TLC (eter de petrol: acetat de etil = 1 : 1, produs R_f = 0,40) a indicat formarea unei nou punct. Cele patru reacții au fost combinate. Amestecul de reacție a fost filtrat și turta de filtrare a fost colectată. Filtratul a fost concentrat sub presiune redusă pentru a da un reziduu. Reziduul a fost triturat cu apă (38,0 L) și filtrat. Turta de filtrare (300 g) a fost triturată cu etanol (600 ml) și filtrată. Cele două turte de filtrare au fost combinate pentru a da compusul 2-5 (1,50 kg, randament 62,2%) ca un solid galben. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 12,31 (s, 1 H), 10,76 (s, 1 H), 6,38 (s, 1 H), 4,35 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,27 (s, 3H), 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 4: Patru reacții au fost efectuate în paralel. O soluție de compus 2-5 (254 g, 848 mmol, 1,0 echiv), compus 1-9 (300 g, 1,06 moli, HCl, 1,25 echiv) și DIPEA (548 g, 4,24 moli, 5,0 echiv) în DMSO (600) mL s-a agitat la 130 °C timp de 16 ore. TLC (acetat de etil: eter de petrol = 2 : 1, R_f = 0,30) și LCMS au arătat că a rămas aproximativ 9% din materia primă. Amestecul a fost răcit la 25°C. Cele patru reacții au fost combinate, turnate în apă cu gheață (12,0 L). S-a format un precipitat galben. Solidul a fost colectat prin filtrare pentru a da compusul 2-6 (1,50 kg, ~76% puritate) sub forma unui solid galben. (m/z): [M+H]⁺ calculat pentru C₂₂H₃₂FN₇O₄S 510,22 găsit 510,2.

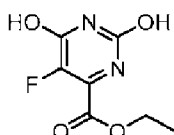
O suspensie de compus 2-6 (440 g, 656 mmol, ~76% puritate) în etanol (1,10 L) a fost încălzită la 95 °C până când solidul a fost dizolvat. Soluția a fost răcită la 25 °C și agitată timp de 12 ore. HPLC a arătat o puritate de ~96,9%. Cele trei reacții au fost combinate. Suspensia a fost filtrată pentru a obține turta de filtrare pentru a da compusul 2-6 (~570 g, puritate 96,9%) ca un solid galben deschis. Produsul a fost utilizat direct pentru etapa următoare. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 12,12 (s, 1 H), 9,73 (s, 1 H), 6,35 (s, 1 H), 5,59 (br s, 1 H), 4,32 (m, 2H), 4,02 (s, 2H), 3,13 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,83 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,64-1,73 (m, 5H), 1,76-1,87 (m, 3H), 5H), 1,29 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 1,21 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Etapa 5: Cinci reacții au fost efectuate în paralel. La o soluție de compus 2-6 (130 g, 255 mmol, 1,0 echiv.) în tetrahidrofuran (3,25 L) și etanol (3,25 L) s-a adăugat NaBH₄ (77,2 g, 2,04 mol, 8,0 echiv) și CaCl₂ (113 g, 1,02 mol, 4,0 echiv.) în porțiuni la 0°C. Amestecul a fost încălzit la 10 °C și agitat timp

de 2 ore. TLC (acetat de etil : eter de petrol = 3 : 1, produs R_f = 0,20) a arătat că reacția a fost completă. Cele cinci reacții au fost combinate. Amestecul a fost stins cu soluție saturată de carbonat de sodiu (6,00 L), diluat cu acetat de etil (15,0 L) și agitat timp de 0,5 ore. Suspensia a fost filtrată pentru a obține filtratul. Stratul organic a fost separat și stratul apos a fost extras cu acetat de etil (5,00 L × 2). Stratul organic combinat a fost spălat cu saramură (5,00 L), uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat pentru a da (I) (500 g, brut) ca un solid galben deschis.

Purificare: Cinci reacții au fost efectuate în paralel. O suspensie de I (100 g, 210 mmol) în etanol (3,00 L) a fost încălzită la 95 °C până când solidul a fost dizolvat. Soluția a fost răcită la 25 °C și agitată timp de 12 ore, s-a format mult precipitat. HPLC a arătat o puritate de 100%. Cele cinci reacții au fost combinate. Solidul a fost colectat prin filtrare pentru a da un total de 330 g de compus I (puritate 99,3%) sub formă de solid galben deschis (Forma I cristalină). (m/z): [M+H]⁺ calculat pentru C₂₀H₃₀FN₇O₃S 468,21 găsit 468,3. ¹H RMN: 400 MHz DMSO-d₆ 5 12,02 (s, 1 H), 9,29 (s, 1 H), 6,34 (s, 1 H), 5,61 (br s, 1 H), 5,02 (t, J = 6,8 Hz, 1 H), 4,33 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 4,02 (s, 2H), 3,12 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 2,84 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,82-2,01 (m, 3H), 1,63-1,74 (m, 5H), 1,21 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Preparatul 3: 5-fluoro-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilat de etil



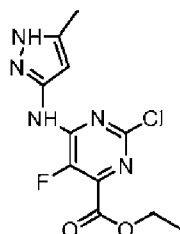
O soluție de acid 5-fluor-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilic (20,4 g, 120 mmol) în DMF (200 mL) a fost tratată cu DBU (18,7 g, 123 mmol) și a fost agitată timp de 0,5 ore la 25 °C. Apoi s-a adăugat EtI (19,2 g, 123 mmol) și soluția rezultată a fost încălzită la 60 °C timp de 3 ore. La amestec s-a adăugat H₂O (1000 mL) și precipitatul rezultat a fost colectat prin filtrare, spălat cu H₂O (200 mL) și uscat pentru a da 5-fluor-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilat de etil (19 g, randament 80 %).

Preparatul 4: 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilat de etil



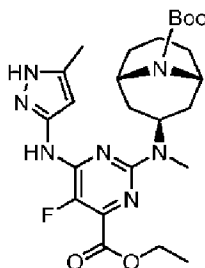
Un amestec de 5-fluor-2,6-dihidroxipirimidin-4-carboxilat de etil (5 g, 24,8 mmol), PhNEt₂ (2,58 g, 17,3 mmol), POCl₃ (130 g, 855,9 mmol) a fost încălzit la 100 °C pentru 4 ore. Apoi amestecul de reacție a fost răcit la temperatura camerei și turnat pe apă cu gheață (500 mL). Stratul apos a fost extras cu EtOAc (1000 mL) și stratul organic a fost spălat cu NaHCO₃ sat. (200 mL), saramură (200 mL), uscat peste Na₂SO₄, filtrat, și concentrat sub vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană (80 g coloană; 0-50% EtOAc în hexani) pentru a se obține 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilat de etil ca un ulei galben (3,8 g, 65 %).

Preparatul 5: 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de etil



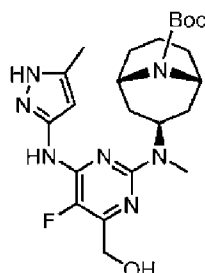
Un amestec de 2,6-dicloro-5-fluoropirimidin-4-carboxilat de etil (3,8 g, 16 mmol), 5-metil-1H-pirazol-3-amina (1,86 g, 19 mmol), și DIPEA (4 g, 32 mmol) în EtOH (100 mL) a fost agitat la r.t. pentru 2 h. Amestecul de reacție a fost concentrat sub vid. Apoi, a fost adăugată apa (500 mL) și amestecul de reacție a fost filtrat și turta de filtrare a fost spălată cu 100 mL de H₂O, și uscată *in vacuo* pentru a se obține 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de etil (3,8 g 80 % randament).

Preparatul 6: (1R,3s,5S)-3-((4-(etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil



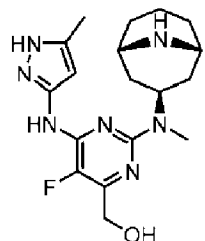
Un amestec de 2-cloro-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de etil (1,7 g, 5,684 mmol), (1R,3s,5s)-3-(metilamino)-9-azabiclo-[3.3.1]-nonan-9-carboxilat de tert-butil (2,17 g, 8,527 mmol), și DIPEA (1,47 g, 11,368 mmol) în DMSO (50 mL) a fost încălzit la 110°C pentru 18 h. Amestecul de reacție a fost turnat în apă (200 mL) și amestecul de reacție a fost filtrat și turta de filtrare a fost spălată cu 200 mL de H₂O și uscată in vid pentru a se obține (1R,3s,5S)-3-((4-(etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiclo[3.3.1]-nonan-9-carboxilatul de tert-butil brut (3,5 g, brut). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₅H₃₇FN₇O₄ 518,29 găsit 518,2.

Preparatul 7: (1R,3s,5S)-3-((5-fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil



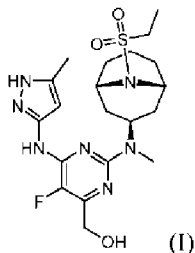
Un amestec de (1R,3s,5S)-3-((4-(etoxicarbonil)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil (3,5 g, 7 mmol), NaBH₄ (2,1 g, 56 mmol), și CaCl₂ (3,1 g, 28 mmol) într-un amestec de EtOH (50 mL) și THF (50 mL) a fost agitat peste noapte la 25 °C. Amestecul de reacție a fost stins cu Na₂CO₃ (aq) (80 mL) și H₂O (80 mL), stratul apos a fost extras cu EtOAc (100 mL × 3) și straturile organice combinate au fost spălate cu saramură, uscate peste Na₂SO₄, și concentrate sub vid. Reziduul a fost purificat prin prep-HPLC pentru a se obține (1R,3s,5S)-3-((5-fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil (1,4 g, 44 %). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₃H₃₅FN₇O₃ 476,28 găsit 476,3.

Preparatul 8: (2-(((1R,3s,5S)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol



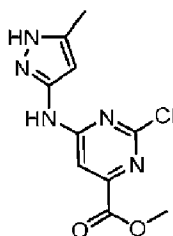
O soluție de (1R,3s,5S)-3-((5-fluoro-4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil (1,4 g, 2,95 mmol) în HCl/dioxan (50 mL) a fost agitată la 25 °C pentru 4 h. Amestecul de reacție a fost filtrat și turta de filtrare a fost spălată cu 100 mL de EtOAc și a fost uscat in vid pentru a se obține (2-(((1R,3s,5S)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol (1,4 g, 100 %). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₈H₂₇FN₇O 376,23 găsit 376,2.

Preparatul 9: (2-(((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabiclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol



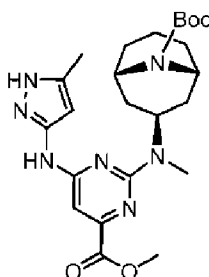
(2-((1R,3s,5S)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-yl(metil)amino)-5-fluoro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanolul (95 mg, 0,253 mmol) a fost dizolvat în Piridina (4,0 ml) și tratat cu clorură de etansulfonil (0,024 ml, 0,253 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat pentru 2 ore și concentrat ulterior în *vid*. Reziduul brut a fost dizolvat în 3 mL de amestec 1:1 de acid acetic /apă, filtrat pentru a îndepărta particulele și purificat prin HPLC preparativă (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm 10 μm, 15 mL/min, 2-50 % ACN + 0,05 % TFA/ACN) folosind un gradient de 2-50% de ACN în apă cu 0,05% TFA). Frațiile pure au fost combinate și liofilizate pentru a furniza sarea TFA a compusului din titlu (12,92 mg, 8,8 % randament, 99,9 % puritate). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₀H₃₁FN₇O₃S 468,22 găsit 468.

Preparatul 10: 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de metil



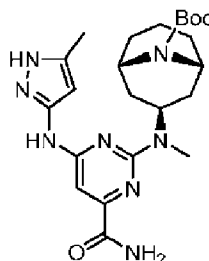
Un amestec de 5-metil-1H-pirazol-3-amina (5,6 g, 58 mmol), 2,6-dicloropirimidin-4-carboxilat de metil (12,0 g, 58 mmol), și DIPEA (15,0 g, 116 mmol) în DMSO (120 ml) a fost agitat la 25 °C pentru 12 ore. H₂O (500 mL) a fost adăugată și precipitatul solid a fost colectat prin filtrare pentru a se obține intermediarul din titlu (15 g, 97 %) ca un solid galben. (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₀H₁₁ClN₅O₂ 268,05 găsit 268,1.

Preparatul 11: (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxycarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil



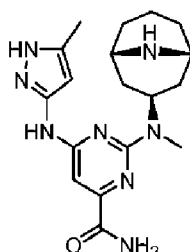
Un amestec de 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de metil (12,0 g, 45 mmol), (1R,3s,5S)-3-(metilamino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de *tert-butil* (13,7 g, 54 mmol), și DIPEA (12,0 g, 90 mmol) în NMP (120 ml) a fost agitat la 120°C pentru 16 ore. Reacția a fost turnată în H₂O (2000 mL), precipitatul solid a fost colectat prin filtrare pentru a se obține intermediarul din titlu (15 g, 68 %) ca un solid alb. (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₄H₃₆N₇O₄ 486,28 găsit 486,3.

Preparatul 12: (1R,3s,5S)-3-((4-carbamoil-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de tert-butil



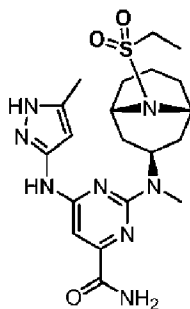
(1R,3s,5S)-3-((4-(metoxycarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de *tert*-butil (3 loturi de 2 g, 4,12 mmol) a fost adăugat NH₃/MeOH (3 aliocoți de 60 mL) într-un tub sigilat de 100 mL, amestecul de reacție a fost agitat la 25 °C pentru 12 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat în *vid* pentru a permite obținerea intermediarului din titlu (3,7 g, 64 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₃H₃₅N₈O₃ 471,28 găsit 471,3.

Preparatul 13: 2-(((1R,3s,5S)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida



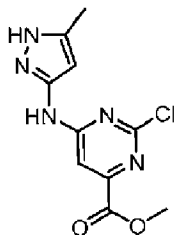
La un amestec de (1R,3s,5S)-3-((4-carbamoil-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-carboxilat de *tert*-butil (3,7 g, 7,9 mmol) în dioxan (185 mL) a fost adăugat HCl/Dioxan (37 mL). Reacția a fost agitată la 25°C pentru 3 ore. TLC a arătat că nu a rămas materie primă. Solventul a fost îndepărtat și produsul brut a fost spălat cu acetat de etil /MeOH (100:1) pentru a se obține intermediarului din titlu ca o sare de HCl (4,0 g, 95 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₈H₂₇N₈O 371,23 găsit 371,1.

Preparatul 14: 2-(((1R,3s,5S)-9-(etilsulfonil)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)-amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida (C-1)



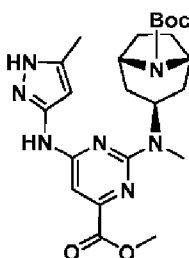
2-(((1R,3s,5S)-9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxamida (40 mg, 0,108 mmol) și DIPEA (0,057 ml, 0,324 mmol) au fost dizolvate în DMF (1,50 ml) și răcite la 0 °C. A fost adăugată clorura de etan sulfonil și amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei și a fost agitat pentru 72 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat în *vid* și produsul brut a fost purificat prin HPLC preparativă în fază inversă (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm 10 um, 15 mL/min, 2-70 % ACN + 0,1 % TFA/ACN) pentru a furniza sarea TFA a compusului din titlu (4,5 mg, 9,01 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₀H₃₁N₈O₃S 463,22 găsit 463,2.

Preparatul 15: 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de metil



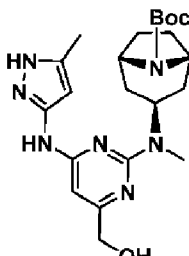
Un amestec de 5-metil-1H-pirazol-3-amina (5,6 g, 58 mmol), 2,6-dicloropirimidin-4-carboxilat de metil (12,0 g, 58 mmol), și DIPEA (15,0 g, 116 mmol) în DMSO (120 ml) a fost agitat la 25 °C pentru 12 ore. A fost adăugată H₂O (500 mL) și precipitatul solid a fost colectat prin filtrare pentru a se obține compusul din titlu (15 g, 97%). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₀H₁₁ClN₅O₂ 268,05 găsit 268,1.

Preparatul 16: (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxycarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3.2.1] octan-8-carboxilat de *tert*-butil



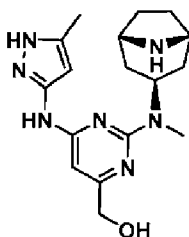
Un amestec de 2-cloro-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-carboxilat de metil (8,3 g, 31,0 mmol), (1R,3s,5S)-3-(metilamino)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-carboxilat de *tert*-butil (8,2 g, 34,1 mmol), și DIPEA (10,8 mL, 62,0 mmol) în DMSO (85 ml) a fost agitat la 120°C pentru 16 ore. Amestecul a fost turnat în 2 L de apă, agitat viguros și apoi filtrat pentru a permite obținerea compusului din titlu (11,1 g, 76 %). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₃H₃₄N₇O₄ 472,27 găsit 472,3.

Preparatul 17: (1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-carboxilat de *tert*-butil



La un amestec de NaBH₄ (8 g, 212 mmol) în MeOH (100 mL) a fost adăugat (1R,3s,5S)-3-((4-(metoxycarbonil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-carboxilat de *tert*-butil (10 g, 21,2 mmol) în THF (100 mL) la 0°C. Amestecul de reacție a fost apoi încălzit la reflux pentru 1 h. Reacția a fost stinsă cu apă (500 mL), și amestecul a fost extras cu acetat de etil (3 X 200 mL). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (1 X 100 mL), uscate peste Na₂SO₄ anhidru și concentrate in *vid*. Reziduul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă pe silicagel (eter de petrol: acetat de etil =4:1) pentru a permite obținerea compusului din titlu (7 g, 68 %). (m/z): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₂H₃₄N₇O₃ 444,27 găsit 444,3.

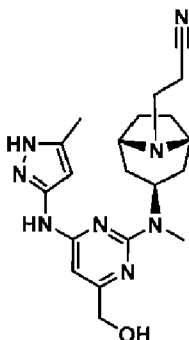
Preparatul 18: (2-(((1R,3s,5S)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)pirimidin-4-il)metanol



Un amestec de (1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-carboxilat de *tert*-butil (6,5 g, 14,7 mmol) în HCl/dioxan

(100 mL) a fost agitat la r.t. pentru 1 h. Amestecul a fost concentrat *in vid* pentru a permite obținerea sării de HCl a intermediarului din titlu (4,8 g, 100 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calc. pentru C₁₇H₂₆N₇O 344,22 găsit 344,1.

Preparatul 19: 3-(((1R,3s,5S)-3-((4-(hidroximetil)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)amino)-pirimidin-2-il)(metil)amino)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-il)propanitril (C-2)



(2-(((1R,3s,5S)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)(metil)amino)-6-((5-metil-1H-pirazol-3-il)pirimidin-4-il)metanolul (50 mg, 0,146 mmol) și DIPEA (0,076 ml, 0,437 mmol) au fost dizolvate în MeOH (1,50 ml). A fost adăugat acrilonitrilul (0,014 ml, 0,218 mmol) și amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei pentru 90 min. Amestecul de reacție a fost apoi concentrat *in vid* și reziduul brut a fost purificat prin HPLC preparativă în fază inversă (Agilent Dynamax 250 x 21,4 mm 10 μm, 15 mL/min, 2-60 % ACN + 0,1 % TFA/ACN) pentru a furniza sarea TFA a compusului din titlu (14 mg, 19 %). (*m/z*): [M+H]⁺ calc. pentru C₂₀H₂₉N₈O 397,25 găsit 397,1.

Exemplul 1: Difrakția de raze X pe pulbere a formei cristaline I

Difrakția cu raze X pe pulbere de formă cristalină I

Modelele de difracție de raze X pe pulbere din figura 1 au fost obținute cu un difractometru de raze X Bruker D8-Advance utilizând radiație Cu-Kα (λ = 1,54051 Å) cu o tensiune de ieșire de 45 kV și un curent de 40 mA. Instrumentul a fost operat în geometria Bragg-Brentano cu fante incidente, divergență și împrăștiere setate pentru a maximiza intensitatea la probă. Pentru măsurare, o cantitate mică de pulbere (5-25 mg) a fost presată ușor pe un suport de probă pentru a forma o suprafață netedă și supusă expunerii la raze X. Eșantionul a fost scanat în modul 2θ-2θ de la 2° la 35° în 2θ cu o dimensiune a etapei de 0,02° și o viteză de scanare de 0,30°/secunde pe etapă. Achiziția datelor a fost controlată de software-ul de măsurare Bruker DiffraSuite și analizată de software-ul Jade (versiunea 7.5.1). Instrumentul a fost calibrat cu un standard de corindon, cu un unghi de ±0,02° doi tetha. Pozițiile de vârf PXRD 2θ observate și spațiile d sunt prezentate în Tabelul 1 pentru Forma I cristalină.

Tabelul 1: Datele PXRD pentru forma cristalină I

2-Theta	d(Å)	Suprafață	A %
5,91	14,94	10324	6,1
6,28	14,06	25530	15
6,75	13,08	27629	16,2
8,08	10,94	3161	1,9
11,19	7,90	70185	41,3
11,73	7,54	170124	100
12,48	7,09	9018	5,3
13,52	6,55	12923	7,6
14,25	6,21	31558	18,5
14,64	6,05	30799	18,1
15,02	5,89	5121	3
15,68	5,65	4744	2,8
16,68	5,31	9857	5,8
17,62	5,03	32112	18,9

2-Theta	d(Å)	Suprafață	A %
18,10	4,90	15613	9,2
18,80	4,72	109849	64,6
19,29	4,60	135137	79,4
20,53	4,32	49854	29,3
21,53	4,12	2321	1,4
22,16	4,01	9590	5,6
24,24	3,67	1915	1,1
25,52	3,49	8578	5
28,93	3,08	3263	1,9
29,89	2,99	10836	6,4
30,44	2,93	3804	2,2

Exemplul 2: Analiza formei I

Calorimetria diferențială de scanare (DSC) a fost efectuată utilizând un modul TA Instruments Model Q-100 cu un controler Thermal Analyst. Datele au fost colectate și analizate folosind software-ul TA Instruments Thermal Analysis. O probă din forma cristalină a fost cântărită cu precizie într-o tavă de aluminiu acoperită. După o perioadă de echilibrare izotermă de 5 minute la 5 °C, proba a fost încălzită folosind o rampă de încălzire liniară de 10 °C/min de la 0 °C la 300 °C. O termogramă reprezentativă DSC a formei cristaline I este prezentată în Figura 2. Termograma prezintă o endotermă de topire cu un debut la aproximativ 248,5 °C și un vârf la aproximativ 250,9 °C. Au fost observate evenimente termice endotermice minore înainte de topire la ~40 °C și ~190 °C.

Măsurătorile analizei termogravimetrice (TGA) au fost efectuate folosind un modul TA Instruments Model Q-50 echipat cu capacitate de înaltă rezoluție. Datele au fost colectate folosind controlerul TA Instruments Thermal Analyst și analizate folosind software-ul TA Instruments Universal Analysis. O probă cântărită a fost plasată pe o tavă de platină și scanată cu o viteză de încălzire de 10 °C de la temperatura ambiantă la 300 °C. Balanța și camerele cuptorului au fost purjate cu flux de azot în timpul utilizării. O urmă reprezentativă de TGA a formei cristaline I a invenției este prezentată în Figura 3. Profilul TGA prezintă o pierdere în greutate de aproximativ 0,70 % între 22 °C - 125 °C, sub purjare cu N₂, și descompunere la o temperatură de debut de aproximativ 250 °C.

Măsurarea sorbției dinamice a umidității (DMS) a fost efectuată utilizând un microbalans atmosferic VTI, sistem SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). A fost utilizată o probă cântărită și umiditatea a fost cea mai mică valoare posibilă (aproape de 0% RH) la începutul analizei. Analiza DMS a constat într-o etapă inițială de uscare (0 % RH) timp de 120 de minute, urmată de două cicluri de sorbție și desorbție cu o rată de scanare de 5 % RH/etapă în intervalul de umiditate de la 5 % RH până la 90 % RH. Executarea DMS a fost efectuată izotermic la 25 °C. O urmă reprezentativă DMS pentru Forma I este prezentată în Figura 4. Absorbția totală de umiditate între 5 și 90% RH a fost de 1,96%.

Analiza Karl Fisher a Formei I a arătat că aceasta conține 1,6% g/g apă.

Preparatul 20: Preparatul Forma II

28 g de compus 2-6 a fost suspendat într-un amestec de 70 mL EtOH și 154 mL THF, apoi a fost răcit la 5 °C. La această suspensie s-au adăugat 82 mL de LiBH₄ (2,0 M în THF) timp de 1 oră. După adăugare, temperatura a fost crescută la 10 °C și s-a agitat pentru 2 ore, după care materia primă nu a fost detectată prin analiza HPLC. Reacția a fost apoi stinsă cu un amestec de 16,8 g clorură de amoniu dizolvată în 77 mL apă. După încălzirea la 45 °C, s-au încărcat 467 ml de apă în 3 ore. Odată ce s-au adăugat 370 mL din această încărcătură de apă, s-a observat formarea de cristale. Când încărcarea cu apă a fost completă, suspensia a fost menținută la 45 °C pentru 5 ore, apoi a crescut la 15 °C peste 3 ore. După menținerea suspensiei la 15 °C timp de 7,5 ore, produsul a fost filtrat și clătit înainte cu 140 mL EtOH urmat de două clătiri înainte de 140 mL cu apă. Solidul a fost uscat sub vid la 45 °C cu azot peste noapte pentru a obține 22,6 g de Forma II (87% randament, 98,6% puritate).

21 g de grad intermediar Forma II de compus (I), obținut în etapa anterioară, în 63 ml de DMSO a fost încălzit la 90 °C. S-au adăugat 420 mL de n-PrOH timp de 40 de minute menținând temperatura amestecului peste 86 °C. Au fost observate cristale de refracție foarte fine în timpul ultimei treimi a adăugării nPrOH. Amestecul a fost agitat pentru 4 ore la 92 °C. Amestecul a fost răcit până la 20 °C peste 8 ore și agitat la 20 °C peste noapte. Produsul a fost filtrat și spălat cu 52,5 ml de nPrOH, urmat de 52,5

ml de etanol de două ori. Solidul a fost uscat sub vid cu o scurgere de azot la 55 °C pentru a se obține 19,24 g de Forma II (92% randament, 99,6% puritate).

Exemplul 3: Difracția cu raze X pe pulbere a formei cristaline II

Modelele de difracție cu raze X pe pulbere din figura 5 au fost obținute în aceleași condiții ca și pentru Forma I. Pozițiile de vârf PXRD 20 observate și distanțe d sunt prezentate în următorul tabel.

Tabelul: Datele PXRD pentru forma cristalină Forma II

2-Theta	d(Å)	Suprafață	A %
8,9	10,0	35511	9,8
9,5	9,3	63058	17,4
10,2	8,7	91113	25,2
11,4	7,7	361711	100
14,4	6,1	29371	8,1
16,2	5,5	160020	44,2
16,6	5,3	173568	48
17,7	5,0	153041	42,3
19,0	4,7	112788	31,2
19,2	4,6	93782	25,9
19,8	4,5	54560	15,1
20,1	4,4	93452	25,8
20,4	4,3	111287	30,8
20,6	4,3	49977	13,8
20,8	4,3	58656	16,2
21,3	4,2	27118	7,5
21,9	4,1	289766	80,1
25,9	3,4	35768	9,9
30,1	3,0	26278	7,3
30,5	2,9	23740	6,6
30,9	2,9	51901	14,3
32,6	2,7	22443	6,2
33,8	2,7	23525	6,5

Exemplul 4: Analiza Formei II

Forma II a fost testată în condiții similare cu Forma I.

O termogramă reprezentativă DSC a formei cristaline II din invenție este prezentată în Figura 6. Termograma prezintă un vârf al fluxului de căldură endotermic, identificat ca o tranziție la topire, care arată un maxim al fluxului de căldură endotermic la o temperatură de 238,1 °C ± 2 °C.

O urmă reprezentativă TGA a formei cristaline II din invenție este prezentată în figura 7. Profilul TGA arată o pierdere în greutate asociată cu descompunerea după 222°C.

Analiza DMS a constatat într-o etapă inițială de uscare (0 % RH) timp de 120 de minute, urmată de două cicluri de sorbție și desorbție cu o rată de scanare de 5 % RH/etapa în intervalul de umiditate de la 5 % RH până la 90 % RH. Executarea DMS a fost efectuată izotermic la 25 °C. O urmă reprezentativă DMS pentru Forma II este prezentată în Figura 8. Absorbția totală de umiditate între 5 și 90% RH a fost de aproximativ 0,02%.

Exemplul 5: Difracția cu raze X pe un singur cristal de Forma II

Datele au fost colectate pe un difractometru Rigaku Oxford Diffraction Supernova Dual Source, Cu at Zero, Atlas CCD echipat cu un dispozitiv de răcire Oxford Cryosystems Cobra. Datele au fost colectate folosind radiația Cu K α . Structura a fost rezolvată și rafinată folosind software-ul cristalografic Bruker AXS SHELXTL suite. Detaliile complete pot fi găsite în CIF. Dacă nu se specifică altfel, atomii

de hidrogen atașați de carbon au fost plasați geometric și lăsați să se rafineze un parametru de deplasare izotropă. Atomii de hidrogen atașați la heteroatomi au fost localizați într-o hartă Fourier diferențială și au fost lăsați să se rafineze liber cu un parametru de deplasare izotropă.

Tabelul: Date din analiza de difracție cu raze X cu un singur cristal de Forma II

Formula empirică	C ₂₀ H ₃₀ FN ₇ O ₃ S
Greutatea moleculară	467.57
Dimensiunea cristalului	0.10 × 0.10 × 0.02 mm ³
Temperatura la colectarea a datelor	293(2) K
Lungimea de undă utilizată pentru colectarea datelor	1.54178 Å
Sistemul cristalin	Monoclinic
Grupul spațial	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
Dimensiunile unității celulei	<i>a</i> = 12.4330(8) Å
	<i>b</i> = 12.2675(9) Å
	<i>c</i> = 14.5337(8) Å
	<i>α</i> = 90°
	<i>β</i> = 96.996(6)°
	<i>γ</i> = 90°
Volumul unității celulei	2200.2(2) Å ³
Z (Numarul de molecule în unitatea celulei)	4
Densitate (calculat)	1.412 g / cm ³
Intervalul Theta pentru colectarea datelor	4.422 to 75.445°
Indexul intervalelor	-15 ≤ <i>h</i> ≤ 15
	-12 ≤ <i>k</i> ≤ 15
	-18 ≤ <i>l</i> ≤ 18
Reflecțiile colectate	21349
Reflecțiile independente	4442 [R(int) = 0.0762]
Indicii R Final [<i>F</i> ² > 2sigma(<i>F</i> ²)]	R1 = 0.0568, wR2 = 0.1294
Indicii R (toate datele)	R1 = 0.1028, wR2 = 0.1599

5

Teste biologice

Testul 1: Testele biochimice pentru kinazele JAK și Tyk2

Un panou de patru teste biochimice LanthaScreen JAK (JAK1, 2, 3 și Tyk2) au fost efectuate într-un tampon de reacție obișnuit al kinazei (50 mM HEPES, pH 7,5, 0,01% Brij-35, 10 mM MgCl₂ și 1 mM EGTA). Enzimele JAK recombinante marcate cu GST și un substrat peptidic STAT1 marcat cu GFP au fost obținute de la Life Technologies.

Compușii diluați în serie sau discret au fost pre-incubați cu fiecare dintre cele patru enzime JAK și substratul în microplăci albe cu 384 de godeuri (Corning) la temperatura ambiantă timp de 1 oră. ATP a fost adăugat ulterior pentru a iniția reacțiile kinazei în volum total de 10 μL, cu 1% DMSO. Concentrațiile finale de enzimă pentru JAK1, 2, 3 și Tyk2 sunt 4,2 nM, 0,1 nM, 1 nM și, respectiv, 0,25 nM; concentrațiile corespunzătoare de Km ATP utilizate sunt 25 μM, 3 μM, 1,6 μM și 10 μM; în timp ce concentrația de substrat este de 200 nM pentru toate cele patru teste. Reacțiile kinazei au fost lăsate să continue timp de 1 oră la temperatura ambiantă înainte ca un preparat de 10 μL de EDTA (concentrație finală 10 mM) și anticorp Tb-anti-pSTAT1 (pTyr701) (Life Technologies, concentrație finală 2 nM) în tampon de diluție TR-FRET (Life Tehnologii) a fost adăugat. Plăcile au fost lăsate să incubeze la temperatura ambiantă timp de 1 oră înainte de a fi citite pe cititorul EnVision (Perkin Elmer). Semnalele raportului de emisie (520 nm/495 nm) au fost înregistrate și utilizate pentru a calcula valorile procentuale de inhibare pe baza DMSO și controale de fond.

10

15

20

Pentru analiza doză-răspuns, datele procentuale de inhibare au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus și valorile IC_{50} au fost determinate dintr-un model de potrivire robustă cu 4 parametri cu software-ul Prism (Software GraphPad). Rezultatele au fost exprimate ca pIC_{50} (logaritmul negativ al IC_{50}) și ulterior convertite în pKi (logaritmul negativ al constantei de disociere, K_i) utilizând ecuația Cheng-Prusoff.

Tabelul 2: Valorile pKi ale Compusului (I)

	JAK 1 (pKi)	JAK 2 (pKi)	JAK 3 (pKi)	Tyk 2 (pKi)
Compus (I)	10,2	10,2	9,1	9,9

Testul 2: Testul de potență celular JAK: inhibarea fosforilării STAT6 indusă de IL-13 în celulele BEAS-2B

Testul de potență celulară pentru inhibarea JAK a fost efectuat prin măsurarea fosforilării STAT6 induse de interleukina-13 (IL-13, R&D Systems) în celulele epiteliale pulmonare umane BEAS-2B (ATCC). Anticorpul anti-STAT6 (Cell Signaling Technologies) a fost conjugat cu bile acceptoare AlphaScreen (Perkin Elmer), în timp ce anticorpul anti-pSTAT6 (pTyr641) (Cell Signaling Technologies) a fost biotinitat folosind EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific).

Celulele BEAS-2B au fost crescute la 37°C într-un incubator umidificat cu 5% CO_2 în mediu 50% DMEM/50% F-12 (Life Technologies) suplimentat cu 10% FBS (Hyclone), 100 U/mL penicilină, 100 μ g/mL streptomycin (Life Technologies) și 2 mM GlutaMAX (Life Technologies). În ziua 1 a testului, celulele au fost însemănțate la o densitate de 7500 celule/godeu în plăci albe cu 384 de godeuri acoperite cu poli-D-lizină (Corning) cu 25 μ L mediu și au fost lăsate să adere peste noapte în incubator. În ziua a 2-a a testului, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu 12 μ L tampon de analiză (soluție de sare Hank's Balanced/HBSS, 25 mM HEPES și 1 mg/mL albumină serică bovină/BSA) care conține răspunsuri la doză de compuși de testat. Compusul a fost diluat în serie în DMSO și apoi diluat încă de 1000 de ori în mediu pentru a aduce concentrația finală de DMSO la 0,1%. Celulele au fost incubate cu compuși de testare la 37°C timp de 1 oră și au fost urmate de adăugarea a 12 μ L de IL-13 preîncălzit (80 ng/mL în tampon de testare) pentru stimulare. După incubare la 37°C timp de 30 de minute, tamponul de analiză (conținând compus și IL-13) a fost îndepărtat și 10 μ L de tampon de liză celulară (25 mM HEPES, 0,1 % SDS, 1 % NP-40, 5 mM $MgCl_2$, 1,3 mM EDTA, 1 mM EGTA și supliment cu inhibitori Complete Ultra mini protează și PhosSTOP de la Roche Diagnostics). Plăcile au fost agitate la temperatura ambiantă timp de 30 de minute înainte de adăugarea de reactivi de detectare. Un amestec de perle acceptoare conjugate de biotină-anti-pSTAT6 și anti-STAT6 a fost adăugat mai întâi și incubat la temperatura ambiantă timp de 2 ore, urmat de adăugarea de granule donatoare conjugate cu streptavidină (Perkin Elmer). După cel puțin 2 ore de incubare, plăcile de analiză au fost citite pe cititorul de plăci EnVision. Semnalele de luminescență AlphaScreen au fost înregistrate și utilizate pentru a calcula valorile procentuale de inhibiție pe baza DMSO și controale de fond.

Pentru analiza doză-răspuns, datele de inhibare procentuală au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus, și valorile IC_{50} au fost determinate dintr-un model de potrivire robust cu 4 parametri cu software-ul Prism. Rezultatele pot fi, de asemenea, exprimate ca logaritmul negativ al valorii IC_{50} , pIC_{50} . Compusul (I) a prezentat o valoare pIC_{50} de 8,5 în acest test.

Testul 3: Testul de citotoxicitate

Un test de viabilitate/citotoxicitate a celulelor luminescente CellTiter-Glo a fost efectuat în celulele epiteliale pulmonare umane BEAS-2B (ATCC) în condiții normale de creștere.

Celulele au fost crescute la 37°C într-un incubator umidificat cu 5% CO_2 în mediu 50% DMEM/50% F-12 (Life Technologies) suplimentat cu 10% FBS (Hyclone), 100 U/mL penicilină, 100 μ g/mL streptomycin (Life Technologies) și 2 mM GlutaMAX (Life Technologies). În ziua 1 a testului, celulele au fost însemănțate la o densitate de 500 celule/godeu în plăci albe de cultură de țesut cu 384 de godeuri (Corning) cu 25 μ L mediu și au fost lăsate să adere peste noapte în incubator. În ziua 2 a testului, s-au adăugat 5 μ L de mediu care conține răspunsuri la doză de compuși de testat și s-au incubat la 37°C timp de 48 de ore. Ulterior, s-au adăugat 30 μ L de soluție de detectare CellTiter-Glo (Promega), s-au amestecat pe un agitator orbital timp de 5 minute și s-au incubat timp de încă 10 minute înainte de a fi citit pe cititorul EnVision. Semnalele de luminescență au fost înregistrate și au fost calculate valorile procentuale de control DMSO.

Pentru analiza doză-răspuns, procentele de date de control DMSO au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus pentru a deriva curbele doză-răspuns prin linia care conectează fiecare punct de date. Concentrația la care fiecare curbă depășește pragul de inhibare de 15 % este definită ca CC_{15} . Rezultatele au fost exprimate ca logaritmul negativ al valorii CC_{15} , pCC_{15} .

Este de așteptat ca compușii de testat care prezintă o valoare pCC_{15} mai mică în acest test să aibă o probabilitate mai mică de a provoca citotoxicitate. pCC_{15} pentru compusul (I) a fost 5,36.

Testul 4: Test TARC indus de TSLP in vitro în PBMC uman

Legarea TSLP la receptorul său induce o schimbare conformațională care activează JAK1 și JAK2 pentru a fosforila diverși factori de transcripție, inclusiv STAT3 și STAT5. În celulele imune rezidente pe piele, acest lucru declanșează o cascadă de evenimente intracelulare care au ca rezultat proliferarea celulară, anti-apoptoză, migrarea celulelor dendritice și producerea de citokine și chemokine Th2. În timpul fazei acute a dermatitei atopice, pielea este invadată de limfocitele Th2. În celulele mononucleare primare din sângele periferic (PBMC), TSLP are un efect proinflamator prin activarea celulelor dendritice mieloide pentru a atrage și stimula celulele T. Acest proces este mediat de timus și chemokine reglate de activare (TARC/CCL17). TARC s-a dovedit a fi un biomarker clinic promițător pentru dermatita atopică, cu niveluri serice ridicate indicând patogeniza accelerată a inflamației cutanate.

În acest test, s-a arătat că stimularea TSLP induce eliberarea TARC din PBMC-uri și că acest răspuns este atenuat într-o manieră dependentă de doză după tratamentul cu compusul (I). PBMC-urile (izolate anterior din sânge integral și congelate în părți alicote la -80°C) de la 3 donatori au fost dezghețate, placcate și lăsate să se odihnească la 37°C timp de 1 oră. Celulele au fost pre-tratate timp de 1 oră cu o serie de diluții de 3,7X variind de la 33,3 μM până la 0,95 nM de compus (I). Celulele au fost apoi stimulate cu 10 ng/mL TSLP sau au primit un volum echivalent de mediu simplu ca control bazal. După 48 de ore, supernatanții celulari au fost colectați și TARC a fost măsurat utilizând Kitul ELISA CCL17/TARC Quantikine uman.

Pentru analiza doză-răspuns, datele de inhibare procentuală au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus, și valorile IC₅₀ au fost determinate dintr-un model de potrivire robustă cu 4 parametri cu software-ul GraphPad Prism. Rezultatele pot fi, de asemenea, exprimate ca logaritm negativ al valorii IC₅₀, pIC₅₀. Compusul (I) a prezentat o valoare pIC₅₀ de 7,8 în acest test.

Testul 5: Test farmacocinetic la șobolan

Obiectivul acestui studiu a fost de a evalua farmacocinetica compusului (I) în plasmă după administrarea orală unică (PO, n=3) sau intravenoasă (IV, n=2) la șobolani Sprague Dawley masculi.

La trei șobolani masculi Sprague Dawley s-a administrat o singură doză IV de compus (I) (1,0 mg/kg în 5% DMSO + 20 mM tampon citrat pH4) printr-un cateter venos jugular sau o singură doză PO de 5 mg/kg prin gavaj oral (5,0 mg/kg în 1% HPMC cu 0,1% Tween80). La 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 și 24 de ore după administrarea dozei, probele de sânge au fost extrase prin cateter de venă jugulară în tuburi EDTA și menținute la rece pe gheață înainte de centrifugare (12.000 rpm, 4 min, 4°C). Alicote de plasmă au fost transferate în tuburi cluster și depozitate congelate (-80°C) înainte de bioanalize.

Probele de plasmă au fost agitate în vortex înainte de transferul unei alicote de 50 μl de probă pe o placă cu 96 de godeuri și extrase cu 200 μl de acetonitril conținând un standard intern. După extracție, probele au fost centrifugate timp de 10 minute la 3700 RPM (2809 x g). Supernatantul a fost transferat pe o nouă placă cu 96 de godeuri și apoi diluat în acid formic 0,2% în apă (diluție de trei ori). Pentru toate probele, s-au injectat 10 μL pe o coloană Waters Xbridge (C18 30 x 2,1 mm) cu o viteză de curgere de 0,80 mL/min. Faza mobilă A a constat din acid formic 0,2% în apă și faza mobilă B 0,2% acid formic în acetonitril. Nivelurile plasmatice ale compusului (I) au fost determinate prin analiză LC-MS-MS. Parametrii PK standard au fost determinați utilizând Phoenix WinNonlin, (Certara Inc.).

Tabelul 3: Parametri farmacocinetici

	IV (1 mg/kg)	PO (5 mg/kg)
T_{1/2} (hr)	1,34	ND
C_{max} (μg/ml)	0,907	0,077
AUC (0-t) (μg.hr/ml)	0,291	0,112
CL (L/hr/kg)	3,54	ND
V_{dss} (L/Kg)	1,1	ND
F %	ND	7,7
ND, nedeterminat		

Testul 6: Farmacocinetica cutanată în pielea de mini-porc Hanford

Obiectivul acestui studiu a fost acela de a determina farmacocinetica epidermică, dermică și plasmatică a compusului (I) după o expunere de 24 de ore la pielea intactă de mini-porc Hanford. Compusul (I) a fost formulat la 0,5 % (g/g) în cremă sau unguent așa cum este descris, ca Formulare A și, respectiv, Formulare B, în Tabelul 4.

Tabelul 4: Formulări ale compusului I

Formularea A (cremă)		Formularea B (unguent)	
Compusul (I)	0,5%	Compus (I)	0,5%
Acid Stearic	5%	Octilhidroxistearat	5%
Alcool Cetostearilic	5%	C8-C10 Trigliceride	5%
Palmitat de Izopropil	4%	Vaselina (Petrolatum)	79,5%
Octilhidroxistearat	2%	N-Metilpirolidona	10%
BRIJ S2 (PEG 2 Stearil Eter)	1,08%		
BRIJ S20 (PEG 20 Stearil Eter)	6,92%		
N-Metilpirolidina	10%		
PEG400	10%		
RO Apa	55,5%		

Douăzeci și patru de ore înainte de dozare, părul a fost ras de pe spatulele unor miniporci Hanford de 10-15 kg, expunând o suprafață de cel puțin 700 cm² (aproximativ 10 % din suprafața corpului). La momentul zero, compusul (I) a fost aplicat pe spatulele mini-porcilor la o doză de 25 μL/cm². Pielea a fost acoperită cu un înveliș adeziv pentru a preveni pierderea compusului în cușcă sau așternut. După o expunere de 24 de ore, spatulele au fost spălate ușor cu apă și săpun pentru a îndepărta medicamentul neabsorbit și uscat. Imediat după această spălare, s-a extras sânge prin puncție venoasă de la miniporci. Pielea exterioară (stratul cornos) a fost apoi îndepărtată prin îndepărtarea benzii adezive. La expunerea epidermei a fost luată o biopsie cu puncție de 0,5 cm. Epiderma și derma au fost separate rapid, cântărite și congelate rapid. Probele similare au fost prelevate la 94 de ore și la 168 de ore (7 zile) după dozare la mini-porci. Probele de epidermă și dermă au fost omogenizate în apă 1:10 (g/v) folosind un omogenizator cu ultrasunete Covaris. Probele au fost extrase în 3 volume de acetonitril și cuantificate în raport cu o curbă standard prin analiză LC-MS. După cum evidențiază parametrii farmacocinetici (Tabelul 5), expunerea semnificativă la compus a fost prezentă în straturile epidermei și dermei, în timp ce expunerea în plasmă a fost sub limita de cuantificare (0,001 μg/ml), indicând o absorbție foarte limitată a compusului în circulația sistemică.

Tabelul 5. Parametrii farmacocinetici obținuți pentru ambele formulări ale compusului (I)

	Formularea A	Formularea B
Plasma C _{max} (μg/ml)	<0,001	<0,001
Plasma AUC _{0-t} (μg*hr/ml)	<0,001	<0,001
Epidermă C _{max} (μg/g)	10,9	35,8
Epidermă AUC _{0-t} (μg*hr/g)	395	1320
Dermă C _{max} (μg/g)	0,47	1,52
Dermă AUC _{0-t} (μg*hr/g)	17,8	64,8

Testul 7: Testul farmacodinamic (PD) JAK ex vivo utilizând piele umană proaspăt excizată

Un test farmacodinamic JAK (PD) ex vivo a fost efectuat utilizând țesut de piele uman izolată. Testul PD a folosit piele umană proaspătă (dermatom de 750 μm grosime) care a fost montată în celule Franz statice cu o suprafață de ~0,5 cm². Camerele receptoare ale celulelor Franz au fost umplute cu mediu de cornificare cald (37 °C) și plasate într-un incubator la 37 °C. Pielea a fost dozată local cu 10 μL (~18 μL/cm²) de compus (I) sau vehicul și a fost lăsată în repaus peste noapte (~24 ore). A doua zi, fără re-aplicare a compusului sau vehiculului de testat, mediul a fost înlocuit cu un cocktail de stimulare declinat Th1 constând din TNFα, IFNγ și IL-12. Pielea a fost lăsată în repaus pentru încă 16 ore, apoi recoltată și procesată pentru extracția ARN și qPCR a biomarkerilor: CXCL10, CCL2. GAPDH a fost folosit ca standard intern. Compusul (I) a fost formulat într-o formulare de unguent la o concentrație de 0,5%. Compoziția vehiculului unguent este listată în Tabelul 6. Au fost utilizați un total de trei donatori de piele (testați în patru exemplare/probă/tratament). Efectul tratamentului a fost calculat ca procent de creștere sau scădere a stimulării în comparație cu grupul de vehicul.

Tabelul 6. Compoziția vehiculului unguent

Octilhidroxistearat	5%
C8-C10 Triglicerida	5%
Vaseline (Petrolatum)	79.5%
N-Metilpirolidona	5%
Alcool Benzilic	5%

Rezultatele testului PD pe pielea umană ex vivo

5 Datele sunt prezentate în Tabelul 7. Expresia genei *CXCL10*, care codifică proteina 10 indusă de interferon- γ (IP-10), a fost inhibată de compusul (I) cu 90,1% comparativ cu grupul de control TH1/vehicul. În ceea ce privește gena *CCL2*, care codifică proteina chemoattractantă monocitară 1 (MCP-1), compusul (I) a inhibat răspunsul cu 61,3%. În plus, cu ambele formulări, au fost detectate concentrații mari de compus atât în stratul epidermic, cât și în cel dermic al pielii.

10 **Tabelul 7. Efectul farmacodinamic și depunerea epidermică și dermică a formulării de unguent 0,5% a compusului (I) după aproximativ 40 de ore de expunere continuă pe pielea umană proaspăt excizată**

Compus (I)	PD- % Inhibare (media $\pm$ SD)		PK- Concentrația țesutului (μ M, media $\pm$ SD)	
	CXCL10	CCL2	Epidermă	Dermă
0,5% unguent	90,1 $\pm$ 15,1	61,3 $\pm$ 39,6	116,5 $\pm$ 91,9	6,1 $\pm$ 5,3

Datele sunt prezentate ca media $\pm$ Std dev, n= 12 (3 donori, 4 probe/donor).

15 **Testul 8: Testul de permeabilitate a pielii umane**

Obiectivul acestui experiment a fost de a evalua absorbția percutanată a compușilor de testat prin pielea umană după aplicarea topică. Modelul folosește piele umană excizată montată în camere de difuzie special concepute (statice sau cu flux) care permit menținerea pielii la o temperatură și umiditate care se potrivesc condițiilor reale de utilizare. Formularea a fost aplicată pe suprafața pielii și penetrarea medicamentului este măsurată prin monitorizarea ratei sale de apariție în soluția de receptor care curge sub probele de piele. Acest sistem in vitro permite controlul atent al multor variabile potențiale implicate în aplicarea topică, cum ar fi volumele de dozare, umiditatea, temperatura, stabilitatea medicamentului și grosimea pielii.

25 Acest experiment a folosit un sistem cu difuzie a celulelor cu flux (MedFlux-HTTM) care utilizează o cale de curgere atent proiectată, cu volume mici de goluri pentru condiții optime de absorbție și s-a dovedit că oferă spațiu local sub pielea dermatomata pentru a genera profile de flux mai precise și mai detaliate prin colectare automată și fluidică optimizată. Acest sistem a fost dezvoltat pentru a minimiza în mod specific suprafața de dozare în timpul experimentelor in vitro, permițând astfel mai multe replicari de dozare în suprafața limitată a pielii umane ex vivo.

30 Celulele de difuzie au fost plasate în suporturi de încălzire celulară și încălzite folosind o baie de apă circulantă pentru a menține temperatura suprafeței pielii la cca. 32°C. Celulele au fost conectate la pompe peristaltice cu mai multe canale și menținute la un debit de aproximativ 10 μ L/min (600 μ L/h) pentru un flux continuu de fluid receptor direct sub piele. După eșantionarea continuă timp de 24 de ore, probele au fost testate pentru nivelurile de compus de testat prin LC-MS/MS. Compusul de testat a fost detectat în fluidul receptor de la 20-28 ore după aplicarea formulării de unguent de testat (n=5). Unguentul utilizat este dezvăluit în Testul 7. Fluidul receptor a fost PBS cu 0,1% Brij.

Tabelul 8. Fluxul compusului (I) care pătrunde prin 1 cm² de piele umană

	N	MedFlux Permeabilitatea (ng/cm ² /sec)	
		Media	Std Dev
Compus (I) (0,5% Unguent)	5	39,1	10,9

După cum se arată în Tabelul 8, compusul (I) a prezentat o permeabilitate adecvată.

40 **Testul 9: Testul de angajare a țintei JAK in vivo IL-31-pSTAT3 la șoareci**

Un model in vivo de producție indusă de IL-31 de traductor de semnal fosforilat și activator al transcripției 3 (pSTAT3) la șoareci a fost utilizat pentru a evalua angajarea țintei locale pe pielea șoarecelui.

Calea de semnalizare JAK/STAT (janus kinaza/transductor de semnal și activator al transcripției) este un element cheie în comunicarea dintre celulele imune și este activată în principal prin receptorii citokine. Legarea citokinei IL-31 duce la activarea și fosforilarea tirozin kinazelor JAK1/JAK2 care, la rândul său, duce la fosforilarea STAT3 (pSTAT3). STAT activat se translocă apoi în nucleu și reglează direct transcrierea genelor sensibile la citokine. În aceste studii, șoarecii Balb/c au fost dozați cu o formulare de unguent a compusului (I). Vehicul de unguent (Tabelul 9) sau compusul (I) formulat în vehiculul de unguent a fost aplicat local pe pielea rasă (25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) cu 30 de minute înainte de injectarea intradermică (50 μl / 1 x 1 cm^2 loc) de IL-31 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) la o zonă de piele rasă de 1x1 cm^2 pe spatele dintre urechi. La o oră după IL-31, au fost colectate biopsii de piele. Probele de țesut au fost congelate rapid și analizate pentru pSTAT3 prin ELISA și concentrația compusului. Compusul (I) a inhibat producția de pSTAT3 cu 80% și concentrația de țesut cutanat a compusului (I) a fost de 62 μM .

Tabelul 9. Compoziția vehiculului unguent

Octilhidroxistearat	5%
C8-C10 Triglicerida	5%
Vaselina (Petrolatum)	79.5%
N-Metilpirolidona	5%
Alcool Benzilic	5%

Testul 10: Model in vivo de dermatită acută indusă de TPA la șoareci

Obiectivul acestui test este de a evalua efectul antiinflamator al compusului (I), într-un model de dermatită acută studiat pentru afecțiuni inflamatorii cutanate, cum ar fi dermatita atopică (Dong și colab., J Pharmacol Exp Ther, 2013). , 344, 436-446).

Aplicarea topică dermică a esterului de forbol TPA la șoareci determină un răspuns inflamator care este caracterizat prin edem și influx de neutrofile în faza incipientă (2-24 ore) și prin proliferarea celulelor epidermice în faza ulterioară (24-48 ore) (Griffiths și colab., Agents and Actions, 1988, 25, 344-351). În acest model, șoarecilor femele Balb/c le-a fost administrat local 20 μl /ureche fie de vehicul sau TPA (2,5 μg). Pentru formularea soluției, vehiculul (1:7 DMSO:Acetonă) sau compusul de testat a fost aplicat local cu 30 de minute înainte și 15 minute după administrarea TPA. Pentru formularea de unguent, vehiculul sau compusul (I) (0,5% concentrație) a fost aplicat cu 30 de minute înainte de TPA. Compoziția vehiculului unguent este enumerată în Tabelul 10. Gradul de inflamație a fost evaluat ca modificarea grosimii urechii la 6 ore după aplicarea TPA.

Rezultatele sunt rezumate în tabelele 11 și 12. Când este dozat ca soluție, compusul (I) (3-1000 μg /ureche) a inhibat creșterea indusă de TPA a grosimii urechii într-o manieră dependentă de doză. Cea mai mare doză testată a inhibat răspunsul TPA cu 54,8%. Când a fost formulat ca un unguent la 0,5%, compusul (I) a inhibat răspunsul TPA cu 34,9%.

Tabelul 10. Compoziția vehiculului unguent

Octilhidroxistearat	5%
C8-C10 Triglicerida	5%
Vaselina (Petrolatum)	79,5%
N-Metilpirolidona	5%
Alcool Benzilic	5%

Tabel 11. Efectul formulării soluției topice de compus (I) asupra creșterii induse de TPA a grosimii urechii la șoareci

Doza de compus (I) (μg /doza ureche ca soluție)	Inhibarea creșterii induse de TPA a grosimii urechii (media % inh $\pm$ SEM (n))
30	6,6% $\pm$ 1,1% (12)
100	2,4% $\pm$ 0,7% (12)
300	35,5% $\pm$ 3,1% (12)
1000	54,8 $\pm$ 2,6% (12)

Tabelul 12. Efectul topic al formulării de unguent a compusului (I) asupra creșterii induse de TPA a grosimii urechii la șoareci

Doza de Compus (I) (20 μl/ureche)	Inhibarea creșterii induse de TPA a grosimii urechii (media % inh ± SEM (n))
0,5% Unguent	34,9% ± 3,3% (12)

Testul 11: Inhibarea pSTAT5 stimulată cu IL-2 în celulele T Tall-1

Potența compușilor de testat pentru inhibarea fosforilării STAT5 stimulată de interleukină-2 (IL-2) a fost măsurată în linia de celule T umane Tall-1 (DSMZ) utilizând AlphaLisa. Deoarece IL-2 semnalează prin JAK1/3, acest test oferă o măsură a potenței celulare JAK1/3.

STAT5 fosforilat a fost măsurat prin trusa AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT5 (Tyr694/699) (PerkinElmer).

Celulele T umane din linia de celule Tall-1 au fost cultivate într-un incubator umidificat la 37°C, 5% CO₂ în RPMI (Life Technologies) suplimentat cu 15% ser fetal bovin inactivat cu căldură (FBS, Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 25mM HEPES (Life Technologies) și IX Pen/Strep (Life Technologies). Compușii au fost diluați în serie în DMSO și distribuiți acustic în godeurile goale. Mediul de testare (DMEM fără roșu de fenol (Life Technologies) suplimentat cu 10% FBS (ATCC)) a fost distribuit (4 μL/godeu) și plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 10 minute. Celulele au fost însămânțate la 45.000 celule/godeu în mediu de testare (4 μL/godeu) și incubate la 37°C, 5% CO₂ timp de 1 oră, urmată de adăugarea de IL-2 (R&D Systems; concentrația finală 300 ng/mL) în mediu de testare preîncălzit (4 uL) timp de 30 de minute. După stimularea cu citokine, celulele au fost lizate cu 6 μl de tampon de liză AlphaLisa 3x (PerkinElmer) care conține 1 x tablete PhosStop și Complete (Roche). Lizatul a fost agitat la 900 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei (RT). STAT5 fosforilat a fost măsurat prin trusa pSTAT5 AlphaLisa (PerkinElmer). Amestecul de perle acceptoare proaspăt preparat a fost distribuit pe lizat (5 uL) sub filtrat verde < 100 lux de lumină. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, rotite scurt în jos și incubate timp de 2 ore la RT în întuneric. Bilele donatoare au fost distribuite (5 μL) sub filtru de lumină verde < 100 lux. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, scurtate în jos și incubate peste noapte la temperatura camerei în întuneric. Luminescența a fost măsurată cu excitație la 689 nm și emisie la 570 nm folosind un cititor de plăci EnVision (PerkinElmer) sub filtru de lumină verde <100 lux.

Pentru a determina potența inhibitoare a compușilor de testat ca răspuns la IL-2, intensitatea medie de emisie a granulelor legate la pSTAT5 a fost măsurată într-o linie de celule T umane. Valorile IC₅₀ au fost determinate din analiza curbelor de inhibare a intensității semnalului în funcție de concentrația compusului. Datele sunt exprimate ca valori pIC₅₀ (logaritm decadic negativ IC₅₀) (media ± abaterea standard). Compusul (I) a prezentat o valoare pIC₅₀ de 8,4 în acest test.

Testul 12: Inhibarea fosforilării STAT4 indusă de IL-12 în celulele T CD3+ umane

Acest test de potență celulară pentru inhibarea JAK a fost efectuat prin măsurarea fosforilării STAT4 induse de interleukina-12 (IL-12, R&D Systems) în celulele T CD3+ umane. Anticorpusul CD3 (Becton Dickinson (BD) Biosciences) a fost conjugat la R-Ficoeritrina (R-PE). Anticorpusul pSTAT4 (pTyr641, BD Biosciences) a fost conjugat cu Alexa Fluor 647.

Celulele mononucleare din sângele periferic uman au fost cultivate la 37°C într-un incubator umidificat cu 5% CO₂ în mediu RPMI (Life Technologies) suplimentat cu 10% FBS (Life Technologies), 100 U/mL penicilină, 100 μg/mL streptomycină (Life Technologies), 2 mM GlutaMAX (Life Technologies), anti CD3 legat de placă (5 μg/mL, UCHT1, BD Biosciences) și anti-CD28 solubil (1 μg/mL, CD28.2, BD Biosciences) timp de 3 zile. Celulele au fost apoi resuspendate în mediu RPMI (Life Technologies) suplimentat cu 10% FBS (Life Technologies), 100 U/mL penicilină, 100 μg/mL streptomycină (Life Technologies), 2 mM GlutaMAX (Life Technologies) și 10 ng/mL interleukină-2 (IL-2, sisteme de cercetare și dezvoltare) pentru încă 3 zile. În ziua testului, celulele au fost spălate în tampon de analiză (RPMI suplimentat cu 0,1% albumină serică bovină (BSA, Sigma), 100 U/mL penicilină, 100 μg/mL streptomycină (Life Technologies) și 2 mM GlutaMAX (Life Technologies)) și resuspendate la 1,25 x 10⁶ celule per ml în tampon de testare. Celulele au fost însămânțate la 250.000 de celule per 100 μl per godeu într-o placă cu fund rotund de polipropilenă, adâncime de 96 de godeuri (Coming) și au fost lăsate să cultive timp de 1 oră. Mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu 50 μL de tampon de analiză care conține răspunsuri la doză de compuși de testat. Compușii au fost preparați ca soluții stoc 10 mM în DMSO. S-au efectuat diluții în serie pentru a genera 11 concentrații de compus de testat la de 1000 de ori concentrația finală de testare în DMSO 100%. Acestea au fost diluate de 25 de ori și apoi de 20 de ori în medii de testare pentru a genera stocuri la 2X peste concentrația de testare finală în 0,2% DMSO. Celulele au fost incubate cu compuși de testare la 37°C timp de 1 oră, urmată de adăugarea a 50 μL de tampon de testare preîncălzit care conține IL-12 (20 ng/mL, sisteme R&D) Concentrația finală de IL-12 este de 10

ng /mL. După incubare la 37°C timp de 30 de minute, celulele au fost fixate cu 100 µL de tampon citofix preîncălzit (BD Biosciences) și incubate timp de 10 minute la 37°C. Celulele au fost apoi centrifugate timp de 5 minute la 322xg, supernatantul a fost aruncat și celulele au fost spălate cu 500 µL de tampon de colorare (1% BSA în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS)). Celulele au fost apoi centrifugate timp de 5 minute la 322xg, supernatantul eliminat și celulele au fost incubate timp de 30 de minute pe gheață cu 500 µL de tampon Perm III pre-răcit (BD Biosciences) pentru a permeabiliza celulele. Apoi, celulele au fost centrifugate timp de 5 minute la 322xg, supernatantul a fost aruncat, spălat cu 1 ml de tampon de colorare, centrifugat încă o dată și granula de celule finală resuspendată în 100 µL de tampon de colorare care conține anti-CD3 R-PE (diluție 1:10) și anti-STAT4 AlexaFluor 647 (diluție 1:50) pentru a colora suprafața celulei și markerii intracelulari. Celulele au fost incubate timp de 45 minute la temperatura camerei în întuneric. După colorarea cu anticorpi, celulele au fost centrifugate timp de 5 minute la 322xg, supernatantul a fost eliminat și celulele au fost spălate cu 500 µL de tampon de colorare. Celulele au fost spălate încă o dată înainte ca conținutul godeului să fie transferat de pe placa de analiză cu godeu adânc pe o placă cu 96 de godeuri cu fund în U de polipropilenă în 200 µL tampon de colorare pentru analiza citometriei în flux. Pentru analiza doză-răspuns, valorile medii ale intensității fluorescenței au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus, și valorile IC₅₀ au fost determinate dintr-un model de potrivire robustă cu 4 parametri cu software-ul Prism. Compusul (I) a prezentat o valoare pIC₅₀ de 7,2 în acest test.

Testul 13: Inhibarea pSTAT6 stimulată cu IL-13 în cheratinocite epidermice umane normale

Potența compușilor de testat pentru inhibarea fosforilării STAT6 stimulată de interleukină-13 (IL-13) a fost măsurată în cheratinocite epidermice umane normale (ATCC) utilizând AlphaLisa. STAT6 fosforilat a fost măsurat prin trusa AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT6 (Tyr641) (PerkinElmer).

Keratinocitele epidermice primare au fost cultivate într-un incubator umidificat la 37°C, 5% CO₂, în mediu bazal de celule dermice (ATCC) suplimentat cu kit de creștere a keratinocitelor (ATCC) și IX Pen/Strep (Life Technologies). Celulele au fost însămânțate la 20.000 celule/godeu în plăci albe cu 384 de godeuri acoperite cu poli-D-lizina (Corning) cu 50 µl și incubate la 37°C, 5% CO₂ peste noapte. În ziua a 2-a a testului, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu 15 uL de mediu care conține răspunsul compușilor de testat. Compușii au fost diluați în serie în DMSO și apoi diluați încă de 1000 de ori în mediu pentru a aduce concentrația finală de DMSO la 0,1%. Celulele au fost incubate cu compuși de testat la 37°C timp de 1 oră și urmate de adăugarea de IL-13 (R&D Systems; concentrație finală 50 ng/mL) în mediu de testare preîncălzit (5 µL) pentru 30 minute.

După stimularea cu citokine, celulele au fost lizate cu 5 µl de tampon de liză AlphaLisa 5x (PerkinElmer) conținând 1x tablete PhosStop și Complete (Roche). Lizatul a fost agitat la 900 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei (RT). STAT6 fosforilat a fost măsurat prin trusa pSTAT6 AlphaLisa (PerkinElmer). Amestecul de bile acceptoare proaspăt preparat a fost distribuit pe lizat (10 uL) sub filtrat verde < 100 lux lumină. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, rotite scurt în jos și incubate timp de 2 ore la RT în întuneric. Bilele donatoare au fost distribuite (10 uL) sub filtrat verde < 100 lux de lumină. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, scuturate în jos și incubate peste noapte la temperatura camerei în întuneric. Luminescența a fost măsurată cu excitație la 689 nm și emisie la 570 nm folosind un cititor de plăci EnVision (PerkinElmer) sub lumină verde filtrat <100 lux.

Semnalele de luminescență au fost înregistrate și utilizate pentru a calcula valorile procentuale de inhibare pe baza DMSO și martori. Pentru analiza doză-răspuns, datele de inhibare procentuală au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus, și valorile IC₅₀ au fost determinate dintr-un model de potrivire robustă cu 4 parametri cu software-ul Prism. pIC₅₀ al compusului (I) a fost 8,3 în acest test.

Testul 14: Inhibarea pSTAT3 stimulată cu IL-22 în cheratinocite epidermice umane normale

Potența compușilor de testat pentru inhibarea fosforilării STAT3 stimulată de interleukină-22 (IL-22) a fost măsurată în cheratinocite epidermice umane normale (ATCC) utilizând AlphaLisa. STAT3 fosforilat a fost măsurat prin trusa AlphaLISA SureFire Ultra pSTAT3 (Tyr705) (PerkinElmer).

Keratinocitele epidermice primare au fost cultivate într-un incubator umidificat la 37°C, 5% CO₂, în mediu bazal de celule dermale (ATCC) suplimentat cu kit de creștere a keratinocitelor (ATCC) și IX Pen/Strep (Life Technologies). Celulele au fost însămânțate la 20.000 celule/godeu în plăci albe cu 384 de godeuri acoperite cu poli-D-lizina (Corning) cu 50 µl și incubate la 37°C, 5% CO₂ peste noapte. În ziua a 2-a a testului, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu 15 µL de mediu care conține răspunsul la doză a compușilor de testat. Compușii au fost diluați în serie în DMSO și apoi diluați încă de 1000 de ori în mediu pentru a aduce concentrația finală de DMSO la 0,1%. Celulele au fost incubate cu compuși de testat la 37°C timp de 1 oră și urmate de adăugarea de IL-22 (R&D Systems; concentrație finală 50 ng/mL) în mediu de testare preîncălzit (5 µL) pentru 30 minute.

După stimularea cu citokine, celulele au fost lizate cu 5 µl de tampon de liză AlphaLisa 5x (PerkinElmer) conținând 1x tablete PhosStop și Complete (Roche). Lizatul a fost agitat la 900 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei (RT). STAT3 fosforilat a fost măsurat prin trusa pSTAT3 AlphaLisa (PerkinElmer). Amestecul de bile acceptoare proaspăt preparat a fost distribuit pe lizat (10 uL) sub filtrat

verde < 100 lux lumină. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, rotite scurt în jos și incubate timp de 2 ore la RT în întuneric. Bilele donatoare au fost distribuite (10 µL) sub filtru de lumina verde < 100 lux. Plăcile au fost agitate la 900 rpm timp de 2 minute, scuturate în jos și incubate peste noapte la temperatura camerei în întuneric. Luminescența a fost măsurată cu excitație la 689 nm și emisie la 570 nm folosind un cititor de plăci EnVision (PerkinElmer) sub filtru de lumină verde <100 lux.

Semnalele de luminescență au fost înregistrate și utilizate pentru a calcula valorile procentuale de inhibare pe baza DMSO și martori. Pentru analiza doză-răspuns, datele de inhibare procentuală au fost reprezentate grafic față de concentrațiile de compus, și valorile IC₅₀ au fost determinate dintr-un model de potrivire robust cu 4 parametri cu software-ul Prism. pIC₅₀ al compusului (I) a fost 8,4 în acest test.

10 **Testul 15: Recuperarea filagrinei suprimate IL-22 în cheratinocite epidermice umane normale**

Se știe că IL-22 inhibă expresia genelor de diferențiere terminală, cum ar fi Filagrina. Nivelul de recuperare al compusului de testat pentru expresia filagrinei suprimată a interleukinei-22 (IL-22) a fost măsurat în cheratinocitele epidermice umane normale (ATCC) utilizând PCR în timp real.

Keratinocitele epidermice primare au fost cultivate într-un incubator umidificat la 37°C, 5% CO₂, în mediu bazal de celule dermice (ATCC) suplimentat cu kit de creștere a keratinocitelor (ATCC) și IX Pen/Strep (Life Technologies). Celulele au fost însemănțate la 5.000 celule/godeu în plăci BioCoat cu 96 de godeuri (Corning) cu 100 µl și incubate la 37°C, 5% CO₂ timp de 3 până la 4 zile până la confluență de 100%. Apoi, mediul a fost îndepărtat și înlocuit cu 150 µL de mediu care conține răspunsul la compușii de testat. Compușii au fost diluați în serie în DMSO și apoi diluați încă de 1000 de ori în mediu pentru a aduce concentrația finală de DMSO la 0,1%. În ziua 1 a testului, celulele au fost incubate cu compușii de testat la 37°C timp de 1 oră și au fost urmate de adăugarea de IL-22 (R&D Systems; concentrația finală 50 ng/mL) în mediu preîncălzit (50 µL) timp de 4 zile. Mediul cu compușii de testat și IL-22 a fost schimbat o dată în ziua 3. În ziua 5, celulele au fost spălate cu IX PBS (Gibco) și lizate cu 50 µl de tampon de liză conținând 0,5 µl Dnasel din Kitul TaqMan® Gene Expression Cells-to-Ct™ (Life Technologies). După incubarea la temperatura camerei (RT) timp de 5 minute, s-au adăugat 5 µl de soluție Stop din kit și apoi s-au incubat la RT timp de 2 minute. S-au amestecat 11,25 µl de lizat, 12,5 µl de tampon 2X RT și 1,25 µl amestec de enzime 20X RT din kit. Reacția de transcripție inversă a fost efectuată prin incubarea amestecului la 37°C timp de 60 de minute și apoi la 95°C timp de 5 minute pentru a genera cADN. Pentru a asambla cocktailul PCR, fiecare reacție a conținut 10 µl de 2X TaqMan® Gene Expression Master Mix, 1 µl de 2X TaqMan® Filaggrin Gene Expression Assay (Life Technologies), 1 µl de 2X TaqMan® UBC Gene Expression Assay (Life Technologies), 4 µl de nuclează fără apă și 4 µl de cADN. Reacțiile PCR au fost efectuate pe EtapaOnePlus™ (Life Technologies) cu condiții ciclice de 50°C timp de 2 minute, 95°C timp de 10 minute urmate de 40 de cicluri de 95°C timp de 15 secunde și 60°C timp de 1 minut. Semnalele de fluorescență au fost captate după fiecare ciclu. Metoda CT comparativă a fost utilizată pentru a cuantifica expresia genei cu celule fără IL-22 și compușii de testare ca control de bază.

Recuperarea compusului (I) pentru expresia filagrinei suprimată interleukina-22 (IL-22) a fost observată la o concentrație < 1 µM.

40 **Testul 16: Testul de permeabilitate Caco-2**

Testul de permeabilitate Caco-2 a fost utilizat ca un indicator al permeabilității pielii. Testul măsoară viteza cu care compușii de testat în soluție pătrund într-un monostrat celular (proiectat să imite joncțiunea strânsă a monostraturilor umane intestinale subțiri).

Plăcile transwell cu 24 de godeuri CacoReady au fost obținute de la ADMecell (Alameda, CA). Compușii au fost evaluați la o concentrație de 5 µM din soluții stoc de DMSO 10 mM în duplicat (n=2). Permeabilitatea pasivă a compușilor testați a fost evaluată folosind monostraturi de celule Caco-2 împreună cu Verapamil (25 uM) pentru a inhiba proteinele de transport P-gp în direcția apicală spre bazolaterală (A-B). Experimentul a fost efectuat într-un incubator la 37°C, 5% CO₂. Mediul de cultură Caco-2 a constat din filtrat standard DMEM, FCS 10%, L-Glutamină 1% și PenStrep 1%. Placa de analiză bazală a fost preparată prin adăugarea a 750 µL de tampon de transport la godeurile A-B. O placă CacoReady™ a fost preparată prin îndepărtarea mediului Caco-2 din godeurile apicale și înlocuirea cu mediu de transport proaspăt (200 uL repetate pentru un total de 3 spălări). Mediul martor (200 µL) a fost apoi înlocuit cu compus diluat pentru godeurile A-B. Pentru a începe incubarea, placa bazală a fost îndepărtată din incubator și a fost adăugată secțiunea apicală deasupra acesteia. Au fost colectate probe (40 uL) din compartimentele apicale și bazale pentru timpul zero (t0). Probele au fost colectate din nou după 120 de minute (t120) din compartimentele apicale și bazale. Toate probele au fost diluate și pregătite pentru bioanaliza prin LC-MS/MS. Coeficientul de permeabilitate (Kp, medie A la B + Verapamil Papparent) în cm/sec a fost calculat ca dQ (flux)/(dt x Aria x concentrație).

În acest test, un compus cu o valoare Kp mai mică de aproximativ 5 x 10⁻⁶ cm/sec este considerat a avea permeabilitate scăzută. Un compus având o valoare Kp mai mare de aproximativ 20 x 10⁻⁶ cm/sec este considerat a avea o permeabilitate ridicată.

Testul 17: Testul microzomului hepatic uman

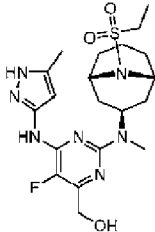
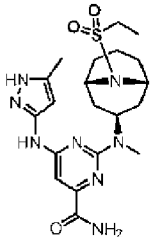
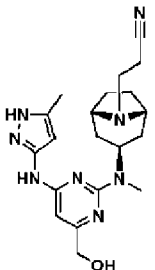
Obiectivul acestei analize a fost de a evalua stabilitatea metabolică a compușilor de testat într-o sub-fracție hepatică umană in vitro. Microzomii hepatici umani obținuți de la Bioreclamation-IVT (Baltimore, MD) au fost dezghețați pe gheață și diluați în tampon fosfat de potasiu 0,1 M pH 7,4 până la concentrații aleatoare ale proteinei de incubare finale de 0,1 mg/mL. Compușii de testat (10 mM) au fost diluați în cofactor NADPH până la concentrații finale aleatorii de incubare de compus de testat 0,1 μM și NADPH 1mM. Incubările au fost efectuate la o temperatură de 37°C și au fost prelevate alicote de testare la punctele de timp 0, 5, 8, 15, 30 și 45 de minute. Fiecare alicotă a fost prăbușită în apă cu acid formic 3% și standard intern 1 μM. Probele rezultate au fost injectate într-un sistem LC-MS/MS pentru analiză.

Pentru fiecare incubare, aria de vârf a analiților din fiecare alicotă t0 a fost setată la 100% și zonele de vârf din alicotele de timp ulterioare au fost convertite în procentul de compus de bază rămas în raport cu t0. Procentul de compus de bază rămas a fost convertit la scară logaritmică naturală și reprezentat grafic în funcție de timp în minute. A fost efectuată o analiză de regresie liniară pentru declinul inițial al profilului de dispariție compusului de bază și a fost determinată o formulă pentru linia cea mai potrivită. Panta liniei rezultate a fost normalizată la concentrația de proteine în mg/ml proteină sau numărul de celule/ml și CL_{int} a fost calculat după cum urmează pentru microzomii hepatici:

$$CL_{int} (\mu L \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}) = \frac{(Panta \times 1000)}{[proteina, mg/mL]}$$

Valorile CL_{int} de la 0-8 μl/min/mg reprezintă clearance-ul scăzut (adică < 30% din fluxul sanguin hepatic la om). Valorile CL_{int} de la 9-49 μl/min/mg reprezintă clearance moderat (adică 30-70% din fluxul sanguin hepatic la om) și valorile > 50 μl/min/mg reprezintă clearance-ul hepatic ridicat (adică >70% din fluxul sanguin hepatic la om).

Caracterizarea compusului (I) și compușii de comparație**Tabelul 13: Caracterizarea compușilor de comparație**

Compus #	Structura	Caco _{overap} K _p 10 ⁻⁶ cm/sec	HLM CL _{int} (μL/min/mg)
(I)		42,3	136
C-1		3,55	6
C-2		5,5	12

Compușii comparativi C-1 și C-2 au fost dezvoltăți de către solicitant în unele prezentări făcute în Aprilie, Iunie și August 2017 la conferințe.

Compusul (I) este caracterizat printr-o permeabilitate mult mai mare (valoarea Cacooverap) și clearance-ul microzomului hepatic uman (valoarea HLM Clint) decât C-1 și C-2. Un clearance mai mare este benefic pentru a promova clearance-ul sistemic rapid și pentru a preveni expunerea sistemică care poate fi asociată cu efecte secundare. O permeabilitate mai mare este benefică pentru indicațiile pielii, deoarece pare să asigure o mai bună penetrare în piele.

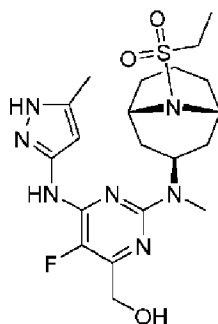
5

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2015/094803
- WO-A1-2016/191524
- US-A1- 2016 052 930

(57) Revendicări:

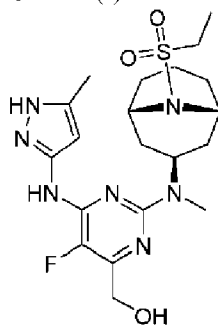
1. Un compus cu formula (I):



(I)

sau o sare a acestuia acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

2. Forma liberă a compusului din revendicarea 1.
3. O formă cristalină a compusului cu formula (I):



(I)

unde forma cristalină este **caracterizată de** un model de difracție cu raze X în pulbere care cuprinde vârfuri de difracție la valori de 2θ de 11.4 ± 0.2 , 16.2 ± 0.2 , 16.6 ± 0.2 , 17.7 ± 0.2 , și 21.9 ± 0.2 .

4. Formă cristalină din revendicarea 3, unde modelul de difracție cu raze X în pulbere este caracterizat în plus prin faptul că are vârfuri de difracție suplimentare la valori de 2θ ale 8.9 ± 0.2 , 9.5 ± 0.2 , și 10.2 ± 0.2 .

5. Forma cristalină conform revendicării 4, în care modelul de difracție cu raze X în pulbere este **caracterizat** în plus prin faptul că are două sau mai multe vârfuri de difracție suplimentare la valori 2θ

selectate dintre 14.4 ± 0.2 , 19.0 ± 0.2 , 19.2 ± 0.2 , 19.8 ± 0.2 , 20.1 ± 0.2 , 20.4 ± 0.2 , 20.6 ± 0.2 , 20.8 ± 0.2 , 21.3 ± 0.2 , 25.9 ± 0.2 , 30.1 ± 0.2 , 30.5 ± 0.2 , 30.9 ± 0.2 , 32.6 ± 0.2 , și 33.8 ± 0.2 .

6. Forma cristalină conform revendicării 3, în care forma cristalină este **caracterizată printr-o** calorimetrie cu scanare diferențială înregistrată la o viteză de încălzire de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pe minut care arată un flux de căldură endotermic maxim cu un vârf la $238.1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7. Compoziție farmaceutică cuprinzând un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 2 și un purtător acceptabil farmaceutic.

8. Compoziție farmaceutică cuprinzând o formă cristalină conform oricăreia dintre revendicările 3 până la 6 și un purtător acceptabil farmaceutic.

9. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7, care mai cuprinde unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari.

10. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7, în care compoziția farmaceutică este un unguent sau o cremă.

11. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7, în care compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este prezent între 0,1 și 10 % în greutate.

12. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7, în care compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este prezent între 0,25 și 5% în greutate.

13. Compoziție farmaceutică conform revendicării 7, în care compusul (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este prezent între 0,05 și 0,5% în greutate.

14. Compus conform revendicării 1 sau 2, pentru utilizare în tratamentul unei boli inflamatorii sau autoimune a pielii la un mamifer.

15. Compus conform revendicării 14, pentru utilizare în tratamentul unei boli inflamatorii de piele la un mamifer.

16. Compus conform revendicării 15, pentru utilizare în tratamentul dermatitei atopice.

17. Compus conform revendicării 16, în care dermatita atopică este dermatită atopică moderată până la severă.

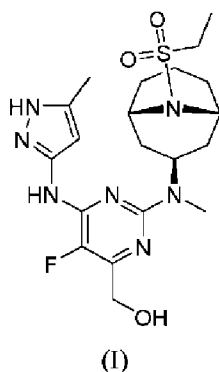
18. Compus conform revendicării 16, în care dermatita atopică este dermatită atopică ușoară până la moderată.

19. Compus conform revendicării 14, pentru utilizare în tratamentul alopeciei areata.

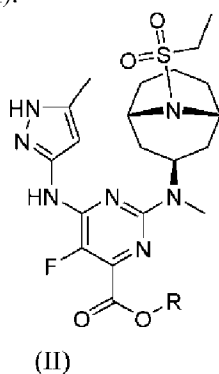
20. Compus conform revendicării 14, pentru utilizare în tratamentul unei boli inflamatorii sau autoimune ale pielii selectate din grupul constând din: vitiligo, prurigo nodularis, lichen plan, dermatită de contact, manifestări cutanate ale bolii grefă versus gazdă, pemfigoid, lupus discoid, lichen sclerosus, lichen planopilar, psoriazis și foliculita decalvanta.

21. Compus conform revendicării 14, pentru utilizare în tratamentul psoriazisului.

22. Un procedeu pentru prepararea unui compus cu formula (I):



sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic, care cuprinde:
(a) reacția unui compus cu formula (II):



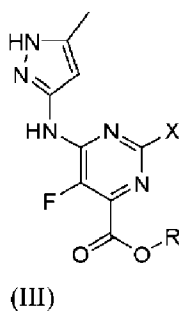
unde R este o grupare C₁₋₁₂ alchil cu un agent reducător și

(b) opțional formarea unei săruri acceptabile farmaceutic pentru a furniza un compus cu formula (I), sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic.

23. Procedeu din revendicarea 22, unde agentul reducător este selectat din grupul constând din LiAlH₄, NaBH₄, și LiBH₄.

24. Procedeu din revendicarea 22, unde R este etil.

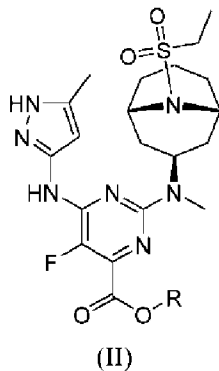
25. Procedeu din revendicarea 22, unde compusul cu formula (II) este obținut prin cuplarea unui compus cu formula (III)



unde X este un halogen, cu un compus cu formula 1-9



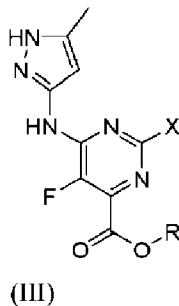
26. Compus cu formula (II):



sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic,
unde R este o grupare C₁₋₁₂ alchil.

27. Compusul din revendicarea 26, unde R este etil.

28. Compus cu formula (III):



sau o sare a acestuia acceptabilă farmaceutic,
unde R este o grupare C₁₋₁₂ alchil și X este halogen.

29. Compus din revendicarea 28, unde R este etil și X este cloro.

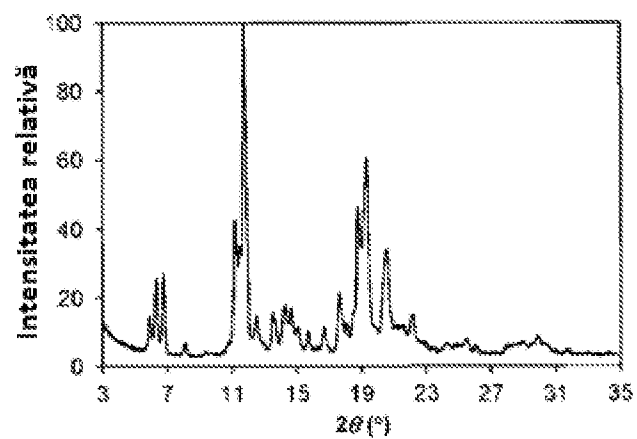


FIG. 1

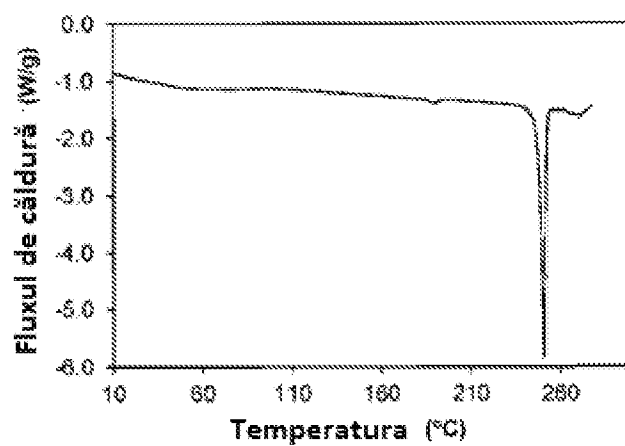


FIG. 2

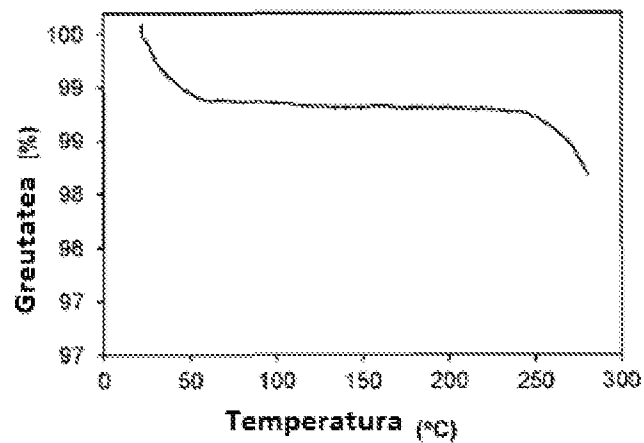


FIG. 3

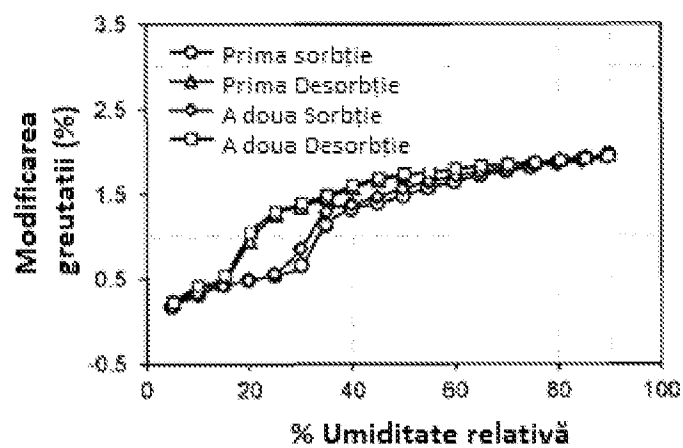


FIG. 4

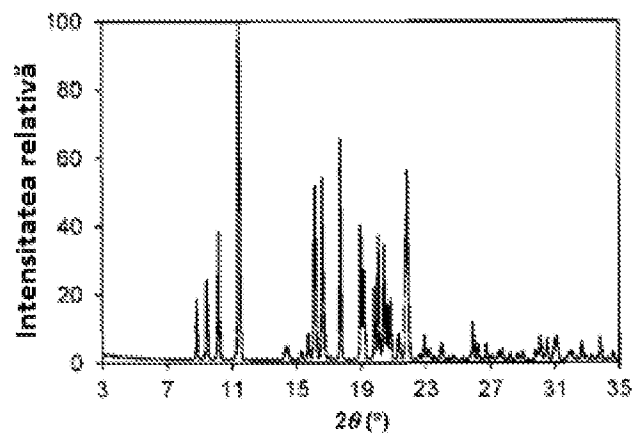


FIG. 5

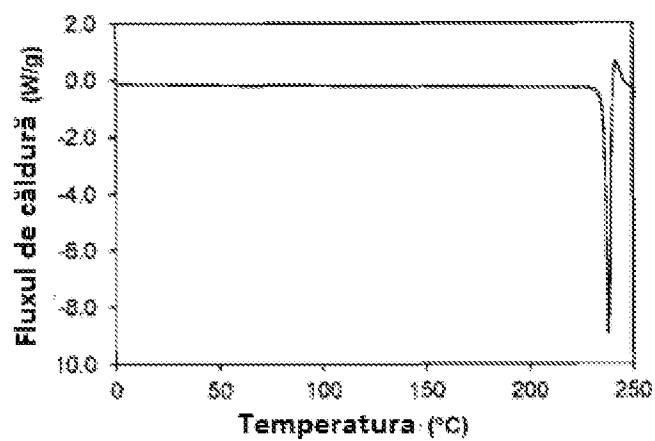


FIG. 6

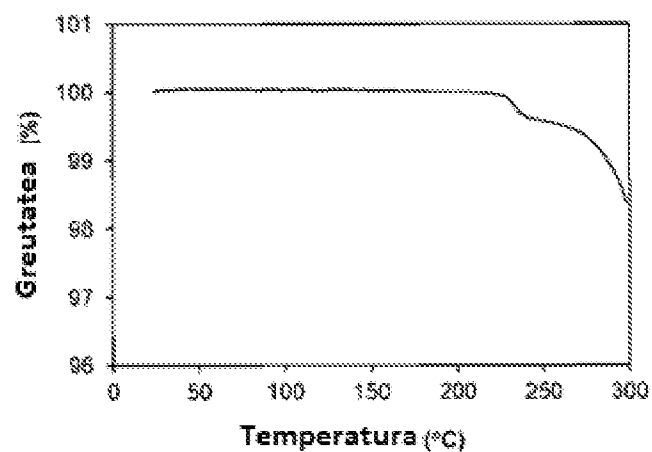


FIG. 7

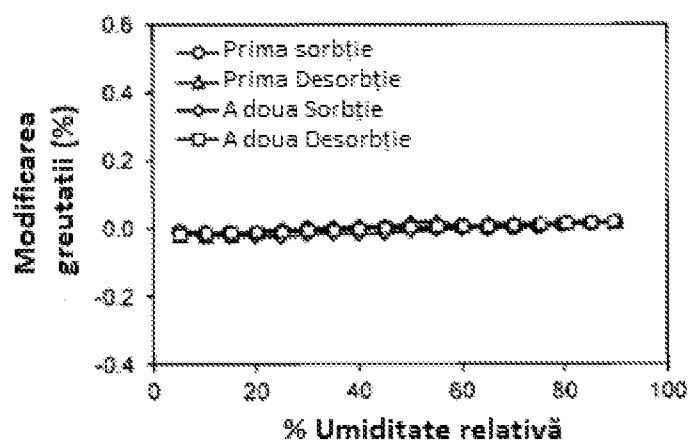


FIG. 8