

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040009**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202091617

(22) Дата подачи заявки
2006.12.12

**(54) ГЕТЕРОАРИЛЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРРОЛО[2,3-D]ПИРИМИДИНЫ В КАЧЕСТВЕ
ИНГИБИТОРОВ ЯНУС-КИНАЗЫ**

(31) 60/749,905; 60/810,231; 60/850,625;
60/856,872; 60/859,404

(56) WO-A1-2002000661
WO-A2-2001042246

(32) 2005.12.13; 2006.06.02; 2006.10.10;
2006.11.03; 2006.11.16

(33) US

(43) 2020.10.30

(62) 201691294; 2006.12.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСАЙТ ХОЛДИНГС
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Роджерс Джеймс Д., Шепард Стейси,
Мадускуи Томас П., Ван Хайшэн,
Фалахатпишех Нику, Рафальски
Мария, Арванитис Аргириос Г.,
Сторейс Льюис, Джаллури Рави
Кумар, Фридман Джордан С., Вадди
Кришна (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к гетероарилзамещенным пирроло[2,3-d]пиримидинам, которые модулируют активность Янус-киназы (JAK) и могут использоваться для лечения заболеваний, связанных с активностью JAK, включая, например, иммунносвязанные заболевания, заболевания кожи, миелоидные пролиферативные заболевания, рак и другие заболевания. Настоящее изобретение относится к лекарственному средству для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK, включающему терапевтически эффективное количество 3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли. При этом указанное соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль; или (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль. Также настоящее изобретение относится к применению указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK.

B1**040009****040009****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к гетероарилзамещенным пирроло[2,3-d]пиримидинам, которые модулируют активность Янус-киназы и могут использоваться для лечения заболеваний, связанных с активностью Янус-киназ, включая, например, заболевания, связанные с иммунной системой, кожные заболевания, миелоидные пролиферативные заболевания, рак и другие заболевания.

Предпосылки создания изобретения

Протеинкиназы (РК) представляют собой группу ферментов, которые регулируют различные важные биологические процессы, включая рост, выживание и дифференциацию клеток, образование и морфогенез органов, неоваскуляризацию, восстановление и регенерацию тканей наряду с прочим. Протеинкиназы проявляют свои физиологические функции, катализируя фосфорилирование белков (или субстратов) и таким образом модулируя клеточную активность субстратов в различном биологическом контексте. Помимо функций в нормальных тканях/органах, многие протеинкиназы также играют более специализированную роль в организме хозяина при заболеваниях человека, включая рак. Набор протеинкиназ (также упоминаемых как онкогенные протеинкиназы), когда нарушена их регуляция, может вызвать образование и рост опухоли и дополнительно вносить вклад в сохранение и прогрессирование опухоли (Blume-Jensen P. et al., *Nature*, 2001, 411 (6835):355-365). До сих пор онкогенные протеинкиназы представляют собой наиболее большую и наиболее привлекательную группу белковых мишеней для вмешательства в раковые заболевания и разработку лекарственных средств.

Протеинкиназы могут быть разделены на киназы рецепторного и нерецепторного типа. Рецепторные тирозинкиназы (RTK) имеют внеклеточную часть, трансмембранный домен и внутриклеточную часть, тогда как нерецепторные тирозинкиназы являются полностью внеклеточными. RTK-опосредованная сигнальная трансдукция обычно инициируется за счет внеклеточного взаимодействия с определенным фактором роста (лиганд), обычно с последующей димеризацией рецептора, стимулирующей активности собственного белка тирозинкиназы и трансфосфорилированием рецептора. Тем самым создаются сайты связывания для молекул внутриклеточной сигнальной трансдукции и это приводит к образованию комплексов со спектром цитоплазматических сигнальных молекул, что облегчает подходящий клеточный ответ, такой как деление, дифференциация клетки, метаболические эффекты и изменения во внеклеточном микроокружении.

В настоящее время идентифицировано по крайней мере девятнадцать (19) различных подсемейств RTK. Одно из подсемейств RTK, обозначаемое HER, включает EGFR, HER2, HER3 и HER4 и связывает такие лиганды, как эпителиальные факторы роста (EGF), TGF- α , амфирегулин, HB-EGF, бетацеллюлин и герегулин. Второе семейство RTK, обозначаемое как подсемейство инсулина, включает INS-R, IGF-1R и IR-R. Третье семейство, подсемейство PDGF, включает PDGF α - и β -рецепторы, CSFIR, c-kit и FLK-II. Другое подсемейство RTK, упоминаемое как подсемейство FLK, охватывает рецептор со вставкой киназного домена, фетальную киназу печени 1 (KDR/FLK-1), фетальную киназу печени 4 (FLK-4) и fms-подобную тирозинкиназу (flt-1). Два других подсемейства RTK были обозначены как FGF семейство рецепторов (FGFR1, FGFR2, FGFR3 и FGFR4) и подсемейство Met (c-Met, Ron и Sea). Подробное обсуждение протеинкиназ см., например, в публикациях Blume-Jensen, P. et al., *Nature*, 2001, 41, 1 (6835):355-365; и Manning, G. et al., *Science*, 2002, 298 (5600):1912-1934.

Нерецепторный тип тирозинкиназ также состоит из множества подсемейств, включая Src, Btk, Abl, FAK и JAK. Каждое из этих подсемейств может быть дополнительно разделено на множество членов, которые часто связаны с онкогенезом. Семейство Src, например, является наибольшим и включает наряду с прочими Src, Fyn, Lck и Fgr. Подробное обсуждение данных киназ см. в Bolen, J.B., *Nonreceptor tyrosine protein kinases*, *Oncogene*, 1993, 8(8):2025-31.

Значительное число тирозинкиназ (как рецепторных, так и нерецепторных) связано с раком (см. Madhusudan, S., Ganesan, T.S., *Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. Clin. Biochem., 2004, 37(7):618-35). Клинические исследования дают возможность полагать, что сверхэкспрессия или нарушение функций тирозинкиназ также могут иметь прогнозируемое значение. Например, члены семейства HER ряда RTK связаны с неблагоприятным прогнозом при раке молочной железы, колоректальном раке, раке головы и шеи и раке легких. Мутация тирозинкиназы c-Kit связана с пониженной выживаемостью при стромальных опухолях желудочно-кишечного тракта. При острой миелогенной лейкемии мутация Flt-3 предсказывает более короткую выживаемость без заболевания. Экспрессия VEGFR, которая является важной для ангиогенеза опухолей, связана с более низкой степенью выживания при раке легких. Экспрессия киназы Tie-1 обратно пропорционально коррелирует с выживанием при раке желудка. Экспрессия Bcr-Abl является важным фактором предсказания ответной реакции при хронической миелогенной лейкемии, а тирозинкиназа Src является индикатором неблагоприятного прогноза на всех стадиях колоректального рака.

Иммунная система дает ответную реакцию на повреждение и угрозу патогенов. Цитокины представляют собой низкомолекулярные полипептиды или гликопротеины, которые стимулируют биологические ответные реакции виртуально во всех типах клеток. Например, цитокины регулируют множество путей, вовлеченных в воспалительную ответную реакцию хозяина на сепсис. Цитокины влияют на кле-

точную дифференциацию, пролиферацию и активацию, и они могут модулировать как провоспалительную, так и противовоспалительную ответную реакцию, давая возможность хозяину подходящим образом реагировать на патогены.

Связывание цитокина с рецептором на поверхности клетки инициирует внутриклеточные сигнальные каскады, которые трансдуцируют межклеточный сигнал в ядро, в конечном счете приводя к изменениям в экспрессии генов. Путь, включающий семейство Янус-киназ протеинтирозинкиназ (JAK) и сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT), занят в передаче сигнала для широкого ряда цитокинов. Обычно цитокиновые рецепторы не обладают собственной тирозинкиназной активностью и следовательно требуют рецептор-связанных киназ для распространения каскада фосфорилирования. JAK выполняют эту функцию. Цитокины связываются с рецепторами, вызывая димеризацию рецепторов, и это дает возможность киназам JAK фосфорилировать друг друга, а также определенные тирозиновые мотивы в цитокиновых рецепторах. STAT, которые распознают данные мотивы фосфотирозина, привлекаются рецептором и затем сами активируются за счет JAK-зависимого фосфорилирования тирозина. После активации STAT диссоциируют от рецептора, димеризуются и направляются в ядро для связывания со специфическими сайтами ДНК и изменения транскрипции (Scott, M.J., Godshall, C.J. et al. (2002), "Jaks, STATs, Cytokines, and Sepsis", Clin Diagn Lab Immunol., 9(6):1153-9).

Семейство JAK играет роль в цитокин-зависимом регулировании пролиферации и функции клеток, вовлеченных в иммунный ответ. В настоящее время имеется четыре известных члена семейства JAK млекопитающих: JAK1 (также известная как Янус-киназа-1), JAK2 (также известная как Янус-киназа-2), JAK3 (также известная как Янус-киназа лейкоцитов, JAKL, 1-JAK и Янус-киназа-3) и TYK2 (также известная как протеин-тирозинкиназа 2). Белки JAK колеблются в размере от 120 до 140 КДа и включают сеть консервативных гомологичных доменов JAK (JH); один из них представляет собой функциональный каталитический киназный домен, и другой представляет собой псевдокиназный домен, потенциально выполняющий регулируемую функцию и/или служащий в качестве стыковочного сайта для STATs (Scott, Godshall et al., 2002, см. выше).

Тогда как JAK1, JAK2 и TYK2 экспрессируются повсеместно, сообщается, что JAK3 предпочтительно экспрессируется в природных киллерных (NK) клетках, а не в Т-клетках в состоянии покоя, что позволяет предположить ее роль в лимфоидной активации (Kawamura, M., McVicar, D.W. et al. (1994), "Molecular cloning of 1-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(14):6374-8).

Не только цитокиностимулированные иммунные и воспалительные ответные реакции действительно вносят свой вклад в защиту хозяина, но они также играют роль в патогенезе заболеваний: патологии, такие как тяжелый объединенный иммунодефицит (SCID) возникают из-за недостаточной активности и подавления иммунной системы, а гиперактивность и аномальная иммунная/воспалительная ответная реакция вносят вклад в патологию аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный и псориатический артрит, астма и системная красная волчанка, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз, сахарный диабет типа I, бульбоспинальный паралич, тиреоидит, иммуноглобулиновые невропатии, миокардит, а также болезни, такие как склеродерма и остеопорит (Ortmann, R.A., Cheng, T. et al. (2000), "Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation", Arthritis Res., 2(1):16-32). Кроме того, абсолютно обычными являются синдромы со смешанным проявлением аутоиммунного и иммунодефицитного заболевания (Candotti, F., Notarangelo, L. et al. (2002), "Molecular aspects of primary immunodeficiencies: lessons from cytokine and other signaling pathways", J. Clin. Invest., 109(10):1261-9). Таким образом, терапевтические агенты обычно направлены на увеличение или подавление иммунных и воспалительных путей соответственно.

Дефицит в экспрессии членов семейства JAK связан с болезненными состояниями. Мыши JAK1 -/- являются мелкими при рождении, плохо выкармливаются и умирают в перинатальный период (Rodig, S.J., Meraz, M.A. et al. (1998), "Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses", Cell, 93(3):373-83). Эмбрионы мышей JAK2 -/- страдают анемией и умирают примерно на 12,5 день после совокупления вследствие отсутствия фиксированного эритропоэза. JAK2-дефицитные фибробласты не дают ответной реакции на IFN гамма, хотя ответные реакции на IFN альфа/бета и IL-6 не затрагиваются.

JAK2 функционирует при сигнальной трансдукции специфической группы цитокиновых рецепторов, необходимых для определяющего эритропоэза (Neubauer, H., Cumano, A. et al. (1998), Cell, 93(3): 397-409; Parganas, E., Wang, D., et al. (1998), Cell, 93(3):385-95). Оказалось, что JAK3 играет роль при нормальном развитии и функционировании В и Т лимфоцитов. Сообщалось, что мутации JAK3 являются ответственными за аутосоматический рецессивный тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID) у людей (Candotti, F., Oakes, S.A. et al. (1997), "Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency", Blood, 90(10):3996-4003).

Путь JAK/STAT и, в частности, всех четырех членов семейства JAK, как предполагается, играет роль в патогенезе астматической ответной реакции, при хроническом обструктивном заболевании легких, бронхите и других родственных воспалительных заболеваниях нижних дыхательных путей. Например, аномальные иммунные ответные реакции, которые характерны для астмы, сочетаются с набором

CD4⁺ Т-хелперных клеток, определяемых как Т-хелперные 2 (Th2) клетки. Передача сигнала посредством цитокинового рецептора IL-4 стимулирует JAK1 и JAK3 для активации STAT6, а передача сигнала посредством IL-12 стимулирует активацию JAK2 и TYK2 и последующее фосфорилирование STAT4. STAT4 и STAT6 контролируют множество аспектов дифференциации CD4⁺ Т-хелперных клеток (Pernis, A.B., Rothman P.B. (2002), "JAK-STAT signaling in asthma", *J. Clin. Invest.*, 109(10):1279-83). Кроме того, было установлено, что TYK2-дефицитные мыши имеют повышенную склонность к аллергическому воспалению дыхательных путей, опосредованному Th2-клетками (Seto, Y., Nakajima, H. et al. (2003), "Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice", *J. Immunol.*, 170(2):1077-83). Более того, множество цитокинов, которые передают сигнал через киназы JAK, связаны с воспалительными заболеваниями или состояниями верхних дыхательных путей, такими как поражающие нос и носовые пазухи (например, ринит, синусит), независимо от того, являются ли они классической аллергической реакцией или нет.

Путь JAK/STAT также вовлечен в воспалительные заболевания/состояния глаз, включая, но не ограничиваясь, указанным: воспаление радужной оболочки глаза, увеит, склерит, конъюнктивит, а также хронические аллергические ответные реакции. Следовательно, ингибирование киназ JAK может играть благоприятную роль при терапевтическом лечении данных заболеваний.

Путь JAK/STAT и, в частности, JAK3, также играет роль при раке иммунной системы. При Т-клеточной лейкемии/лимфоме взрослых (ATLL) CD4⁺ Т-клетки человека приобретают трансформированный фенотип, событие, которое коррелирует с приобретением конститутивного фосфорилирования JAK и STAT. Кроме того, связь между JAK3 и активацией STAT1, STAT3 и STAT5 и развитием клеточного цикла была продемонстрирована путем как окрашивания с помощью иодида пропидия, так и внедрением бромдеоксиуридина в клетки четырех протестированных пациентов с ATLL. Данные результаты позволяют предположить, что активация JAK/STAT связана с репликацией лейкемических клеток и что терапевтические подходы, направленные на ингибирование JAK/STAT могут рассматриваться как останавливающие неопластический рост (Takemoto, S., Mulloy, J.C. et al. (1997), "Proliferation of adult T cell leukemia/lymphoma cells is associated with the constitutive activation of JAK/STAT proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94(25):13897-902).

Блокирование сигнальной трансдукции на уровне киназ JAK дает перспективу разработки подхода к лечению рака человека. Цитокины семейства интерлейкинов 6 (IL-6), которые активируют сигнальный трансдуктор gp130, являются основными факторами выживания и роста для клеток множественной миеломы человека (ММ). Предполагается, что сигнальная трансдукция gp130 вовлекает JAK1, JAK2 и TYK2 и расположенные в прямом направлении (5'-3') эффекторы STAT3 и митоген-активированные протеинкиназные (MAPK) пути. В IL-6 зависимой ММ клеточных линиях, обработанных ингибитором JAK2 тирфостинном AG490, ингибировались активность киназы JAK2 и фосфорилирование ERK2 и STAT3. Кроме того, подавлялась пролиферация клеток и индуцировался апоптоз (De Vos, J., Jourdan, M. et al. (2000), "JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells", *Br. J. Haematol.*, 109(4):823-8). Однако в некоторых случаях AG490 может индуцировать состояние бездействия опухолевых клеток в действительности, затем защитить их от смерти.

Активация JAK/STAT при раке может происходить по многочисленным механизмам, включая стимуляцию цитокина (например, IL-6 или GM-CSF) или за счет уменьшения эндогенных супрессоров передачи сигнала посредством JAK, таких как SOCS (супрессор или цитокиновая передача сигнала) или PIAS (протеиновый ингибитор активированной STAT) (Boudny, V., Kovarik, J., Neoplasm., 49:349-355, 2002). Важным является то, что активация передачи сигнала посредством STAT, а также других путей в прямом направлении от JAK (например, Akt), коррелирует с неблагоприятным прогнозом для многих типов рака (Bowman, T. et al., *Oncogene*, 19:2474-2488, 2000). Кроме того, повышенные уровни циркулирующих цитокинов, которые передают сигнал посредством JAK/STAT, могут неблагоприятным образом влиять на состояние здоровья пациента, поскольку предполагается, что они играют эпизодическую роль при кахексии и/или хронической усталости. По существу ингибирование JAK может иметь терапевтическое значение при лечении рака у пациентов по причинам, которые далеко расширяют потенциал противоопухолевой активности. Данные для кахексии могут привести к дополнительному выигрышу механистической поддержки от того факта, что фактор насыщения - лептин - передает сигналы посредством JAK.

Янус-киназа 3 (JAK3) как фармакологическая цель успешно использовалась для контроля отторжения аллотрансплантата и болезни "трансплантат против хозяина" (GVHD). В дополнение к ее вовлеченности в передачу сигнала цитокиновых рецепторов JAK3 также занята в сигнальном пути CD40 моноцитов периферической крови. Во время CD40-индуцированного созревания миелоидных дендритных клеток (DCs) индуцируется активность JAK3 и увеличивается совместно стимулированная молекулярная экспрессия, продуцирование IL-12, и наблюдается сильная аллогенная стимулирующая способность. Рационально разработанный ингибитор JAK3, WHI-P-154, предотвращает данные действия, останавливая DCs на не созревшем уровне, что позволяет предположить, что иммуносупрессорная терапия, имеющая целью тирозинкиназу JAK3, может также затрагивать функцию миелоидных клеток (Saemann, M.D., Diakos, C. et al. (2003), "Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hypo-

reactivity by targeting of Janus kinase 3", *Am. J. Transplant.*, 3(11):1341-9). На системе мышинной модели также было показано, что JAK3 является важной молекулярной мишенью для лечения аутоиммунного инсулин-зависимого сахарного диабета (типа I). Рационально разработанный ингибитор JAK3, JANEX-1, проявлял сильную иммуномодулирующую активность и замедлял начало появления диабета на NOD-мышинной модели аутоиммунного диабета типа I (Cetkovic-Cvrlje, M., Dragt, A.L. et al. (2003), "Targeting JAK3 with JANEX-1 for prevention of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice", *Clin. Immunol.*, 106(3):213-25).

Было предположено, что ингибирование тирозинкиназы JAK2 может быть благоприятным для пациентов с миелопролиферативными нарушениями (Levin et al., *Cancer Cell*, vol. 7, 2005:387-397). Миело-пролиферативные нарушения (MPD) включают истинную полицитемию (PV), идиопатическую тромбоцитопению (ET), миелоидную метаплазию с миелофиброзом (MMM), хроническую миелогенную лейкемию (CML), хроническую миеломоноцитную лейкемию (CMML), гиперэозинофильный синдром (HES) и системное заболевание тучных клеток (SMCD). Хотя, как полагают, миелопролиферативные нарушения вызывает благоприобретенная соматическая мутация в гематопозитических предшественниках; генетическая основа данных заболеваний неизвестна. Однако сообщалось, что гематопозитические клетки большинства пациентов с PV и значительного числа пациентов с ET и MMM обладают повторяющимися периодически соматическими активирующими мутациями в тирозинкиназе JAK2. Также сообщалось, что ингибирование киназы JAK2V617F небольшими молекулами-ингибиторами приводит к ингибированию пролиферации гематопозитических клеток, что позволяет предположить, что тирозинкиназа JAK2 является потенциальной мишенью для фармакологического ингибирования у пациентов с PV, ET и MMM.

Также предполагается, что ингибирование киназ JAK имеет терапевтическое преимущество для пациентов, страдающих от кожных иммунных нарушений, таких как псориаз и кожная аллергическая реакция. Общеизвестно, что при псориазе обыкновенном, наиболее распространенной форме псориаза, Т-лимфоциты имеют важность для поддержания заболевания и связанными с ним псориатическими бляшками (Gottlieb, A.B. et al., *Nat. Rev. Drug Disc.*, 4:19-34). Псориатические бляшки содержат существенный иммунный инфильтрат, включая лейкоциты и моноциты, а также многочисленные слои эпидермы с повышенной пролиферацией кератиноцита. Тогда как первоначальная активация иммунных клеток при псориазе происходит по зависящему от болезни механизму, предполагается, что поддержание заболевания зависит от числа воспалительных цитокинов, в дополнение к различным хемокинам и факторам роста (JCI, 113:1664-1675). Многие из них, включая интерлейкины -2, -4, -6, -7, -12, -15, -18 и -23, а также GM-CSF и IFN γ , передают сигнал посредством Янус-киназ (JAK) (*Adv Pharmacol*, 2000, 47:113-74). По существу блокирование сигнальной трансдукции на уровне киназ JAK может привести к терапевтическому выигрышу у пациентов, страдающих от псориаза или других иммунных нарушений кожного покрова.

Известно, что некоторые лекарственные средства могут вызывать иммунные реакции, такие как кожная сыпь или диарея у некоторых пациентов. Например, применение некоторых новых направленных противораковых агентов, таких как Иресса, Эритукс и Тарцева, индуцировало угревидную сыпь у некоторых пациентов. Другой пример относится к тому факту, что некоторые наружно применяемые лекарственные средства вызывают раздражение кожи, кожную сыпь, контактный дерматит или аллергическую контактную реакцию кожи. У некоторых пациентов данные иммунные реакции могут вызывать беспокойство, но для других иммунные реакции, такие как сыпь или диарея, могут привести к невозможности продолжать лечение. Хотя движущая сила таких иммунных реакций полностью не ясна, к настоящему времени данные иммунные реакции, вероятно, связаны с иммунным инфильтратом.

Проводится широкий поиск ингибиторов Янус-киназы или родственных киназ и в нескольких публикациях сообщается об эффективных классах соединений. Например, о некоторых ингибиторах сообщается в WO 99/65909, патенте США 2004/0198737, WO 2004/099204, WO 2004/099205 и WO 01/42246. О гетероарилзамещенных пирролах и других соединениях сообщается в WO 2004/72063 и WO 99/62908.

Таким образом, постоянно необходимы новые или усовершенствованные агенты, которые ингибируют киназы, такие как Янус-киназы, которые действуют как иммуноподавляющие агенты при трансплантации органов, а также в качестве агентов для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний (например, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, астма, диабет типа I, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, аутоиммунные нарушения щитовидной железы, болезнь Альцгеймера), заболеваний, которые включают гиперактивную воспалительную ответную реакцию (например, экзема), аллергий, рака (например, рак предстательной железы, лейкемия, множественная миелома) и некоторых иммунных реакций (например, кожная сыпь или контактный дерматит или диарея), вызванных другими лекарственными средствами, некоторые из которых упомянуты. Описанные здесь соединения, композиции и способы отвечают данной необходимости и другим целям.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к лекарственному средству для лечения atopического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK, включающее терапевтически эффективное количество 3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли. При этом соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрил, или его

фармацевтически приемлемую соль или (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил, или его фармацевтически приемлемую соль.

Также изобретение относится к применению указанного соединения 3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли, для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK. Указанное соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил, или его фармацевтически приемлемую соль или (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил, или его фармацевтически приемлемую соль.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к лекарственному средству для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK, включающему терапевтически эффективное количество 3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли. При этом соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль; или (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

Также изобретение относится к применению указанного соединения 3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK. Указанное соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль; или (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

Дополнительно следует понимать, что некоторые отличительные особенности изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть обеспечены в сочетании с единственным вариантом осуществления. Наоборот, различные отличительные особенности изобретения, которые для краткости описаны в контексте единственного варианта осуществления, также могут быть обеспечены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации.

Описанные здесь соединения могут быть асимметрическими (например, содержащими один или несколько стереоцентров). Все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, включены в объем изобретения, если не указано другого. Соединения по настоящему изобретению, которые содержат асимметрически замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активной или рацемической формах. Известные из уровня техники способы получения оптически активных форм из оптически активных исходных веществ включают такие, как разделение рацемических смесей или стереоселективный синтез. Многие геометрические изомеры олефинов, соединений с C=N двойными связями и т.п. также могут присутствовать в описанных здесь соединениях, и все такие стабильные изомеры также подразумеваются в настоящем изобретении. Описаны цис- и транс-геометрические изомеры соединений по настоящему изобретению и они могут быть выделены в виде смеси изомеров или в виде разделенных изомерных форм.

Разделение на оптические изомеры рацемических смесей соединений может быть проведено с помощью любого из многочисленных способов, известных в данной области. Иллюстративный способ включает дробную кристаллизацию с использованием хиральной разделяющей кислоты, которая представляет собой оптически активную солеобразующую органическую кислоту. Подходящими разделяющими агентами для способов дробной кристаллизации являются, например, оптически активные кислоты, такие как D- и L-формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты; или различные оптически активные камфорсульфоновые кислоты, такие как β-камфорсульфоновая кислота. Другие разделяющие агенты, пригодные для способов дробной кристаллизации, включают стереомерно чистые формы α-метилбензиламина (например, S- и R-формы или диастереомерно чистые формы), 2-фенилглицин, норэфедрин, эфедрин, N-метилэфедрин, циклогексилэтиламин, 1,2-диаминоциклогексан и т.п.

Разделение на оптические изомеры рацемических смесей также может быть проведено путем элюирования на колонке, заполненной оптически активным разделяющим агентом (например, динитробензилфенилглицин). Подходящая композиция растворителей для элюирования может быть определена специалистом в данной области.

Соединения по изобретению также включают таутомерные формы. Таутомерные формы являются результатом замены простой связи со смежной двойной связью вместе с сопутствующей миграцией протона. Таутомерные формы включают прототропные таутомеры, которые представляют собой изомерные протонированные состояния, имеющие одну и ту же эмпирическую формулу и общий заряд. Примеры прототропных таутомеров включают пары кетон-енол, пары амид-имидиновая кислота, пары лактам-лаким, пары амид-имидиновая кислота, пары енамин-имин и кольцеобразные формы, где протон может

занимать два или более положений в гетероциклической системе, например 1Н- и 3Н-имидазол, 1Н-, 2Н- и 4Н-1,2,4-триазол, 1Н- и 2Н-изоиндол и 1Н- и 2Н-пиразол. Таутомерные формы могут находиться в равновесии или же они стерически зафиксированы в одной форме за счет подходящего замещения.

Соединения по изобретению дополнительно включают гидраты и сольваты, а также безводные и несольватированные формы.

Соединения по изобретению также включают все изотопы атомов, существующих в промежуточных или конечных соединениях. Изотопы включают те атомы, которые имеют такой же атомный номер, но различные массовые числа. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий.

В некоторых вариантах осуществления, соединения по изобретению и их соли по существу являются выделенными. Под выражением "по существу выделенные" подразумевается, что соединения по крайней мере частично или по существу отделены от окружающей среды, в которой они образовались или были обнаружены. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную соединением по изобретению. Разделение по существу может включать композиции, содержащие по крайней мере примерно 50%, по крайней мере примерно 60%, по крайней мере примерно 70%, по крайней мере примерно 80%, по крайней мере примерно 90%, по крайней мере примерно 95%, по крайней мере примерно 97% или по крайней мере примерно 99% по весу соединения по изобретению или его соли. Способы выделения соединений и солей являются обычными для данной области.

Выражения "температура окружающей среды" и "комнатная температура" как они использованы в данном описании, понятны в данной области и относятся обычно к температуре, например к температуре реакции, которая является близкой к температуре в комнате, где проводят реакцию, например к температуре от примерно 20°C до примерно 30°C.

Выражение "фармацевтически приемлемый" используется в данном описании для упоминания тех соединений, веществ, композиций и/или препаративных дозированных форм которые, в рамках значимого медицинского суждения являются подходящими для применения в контакте с тканями организма человека и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергической ответной реакции или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением преимущество/риск.

Настоящее изобретение также включает фармацевтически приемлемые соли описанных здесь соединений. Для использования в данном описании термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к производным описанных соединений, в которых исходные соединения модифицированы путем преобразования существующего фрагмента кислоты или основания в его солевую форму. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются указанным, соли минеральных или органических кислот и основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.п. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают обычные нетоксичные соли исходных соединений, образованные, например, нетоксичными неорганическими или органическими кислотами. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходных соединений, которые содержат основной или кислотный фрагмент с помощью обычных химических методов. Обычно такие соли могут быть получены путем взаимодействия свободных кислотных или основных форм данных соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде, или в органическом растворителе, или в смеси этих двух растворителей; обычно неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил (MeCN) являются предпочтительными. Перечень подходящих солей можно найти в публикациях Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack-Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418; и Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждая из которых включена в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение также включает пролекарства описанных здесь соединений. Для использования в данном описании термин "пролекарства" относится к ковалентно связанным носителям, которые высвобождают активное исходное лекарственное средство при введении субъекту-млекопитающему. Пролекарства могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, таким образом, что модифицированные группы расщепляются либо при обычных манипуляциях, либо *in vivo*, приводя к исходным соединениям. Пролекарства включают соединения, в которых гидроксильная, amino, сульфгидрильная или карбоксильная группы связаны с любой группой, которая при введении субъекту-млекопитающему расщепляется с образованием свободной гидроксильной, amino, сульфгидрильной или карбоксильной группы соответственно. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются указанным, ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовой и аминной функциональных групп в соединениях по изобретению. Получение и применение пролекарств обсуждается в публикациях Higuchi, T., Stella, V., "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series; и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association и Pergamon Press, 1987, обе из которых включены в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Синтез.

Соединения по данному изобретению, включая их соли, могут быть получены с использованием известных методов органического синтеза и могут быть синтезированы в соответствии с любым из воз-

можных путей синтеза. Реакции получения соединений по изобретению могут быть проведены в подходящих растворителях, которые легко могут быть выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители по существу могут быть не реакционноспособными по отношению к исходным веществам (реагенты), промежуточным соединениям или продуктам при температурах, при которых проводят реакции, например при температурах, которые могут колебаться от температуры замораживания растворителя до температуры кипения растворителя. Данную реакцию можно проводить в одном растворителе или смеси растворителей. В зависимости от конкретной стадии реакции подходящие растворители для конкретной стадии реакции могут быть выбраны квалифицированным специалистом.

Получение соединения по изобретению может включать введение и удаление защиты различных химических групп. Необходимость во введении и удалении защитной группы и выбор подходящей защитной группы легко могут быть определены специалистом в данной области. Вопросы химии защитных групп можно найти в книге Green T.W., Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed., Wiley&Sons, Inc., New York (1999), которая включена в данное описание путем ссылки во всей своей полноте.

Реакции можно контролировать с помощью любого подходящего способа, известного в данной области. Например, образование продукта можно контролировать спектроскопическими методами, такими как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия (например, в видимой и ультрафиолетовой областях света) или масс-спектрометрия, или с помощью хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография.

Соединения по изобретению могут быть получены в соответствии с многочисленными путями синтеза, известными в литературе. Примеры методов синтеза для получения соединений по изобретению приведены ниже на схемах.

Как показано на схеме 1, пирозолсодержащие центральные фрагменты 1-9 и 1-6 могут быть синтезированы исходя из пирроло[2,3-d]пиридина или пирроло[2,3-b]пиримидина 1-1. Соединение 1-1 может быть преобразовано в активные производные, такие как аналог N-оксида (1-2) с использованием окислителя, такого как м-CPBA. N-оксид 1-2 можно галогенировать с использованием галогенирующего агента, такого как сочетание бромиды тетраметиламмония и метансульфонового ангидрида, с образованием 4-галогензамещенного соединения 1-3, такого как 4-бромсодержащее соединение, при восстановлении в то же самое время N-оксида. Аминная группа в соединении 1-3 может быть защищена подходящей защитной группой амина с получением защищенного соединения 1-7, которое впоследствии подвергается кросс-сочетанию по Сузуки с борной кислотой 1-8, давая пирозолсодержащие центральные фрагменты 1-9а, которые далее могут быть подвергнуты взаимодействию с реагентом L-(Y)n-Z (где L представляет собой уходящую группу), приводя к соединениям по изобретению 1-9b. Альтернативно N-оксид 1-2 можно галогенировать с использованием галогенирующего агента, такого как MeSO_2Cl с образованием 4-галогензамещенного соединения 1-4, такого как 4-хлорсодержащее соединение, при восстановлении в то же самое время N-оксида. 4-Хлорсодержащее соединение 1-4 может быть конденсировано с бромзамещенным соединением пирозола 1-5 в подходящих условиях, таких как нагревание, с получением пирозолсодержащего центрального фрагмента 1-6, который может содержать некоторые функциональные группы, такие как бром или циано, подходящие для последующей химической модификации.

Аналогично имидазольный центральный фрагмент 1-11 может быть синтезирован конденсацией 4-галогензамещенного соединения 1-4 с имидазольным производным 1-10 в подходящих условиях, таких как нагревание, с получением имидазолсодержащего центрального фрагмента 1-11, который может содержать некоторые функциональные группы, такие как бром или циано, подходящие для последующей химической модификации.

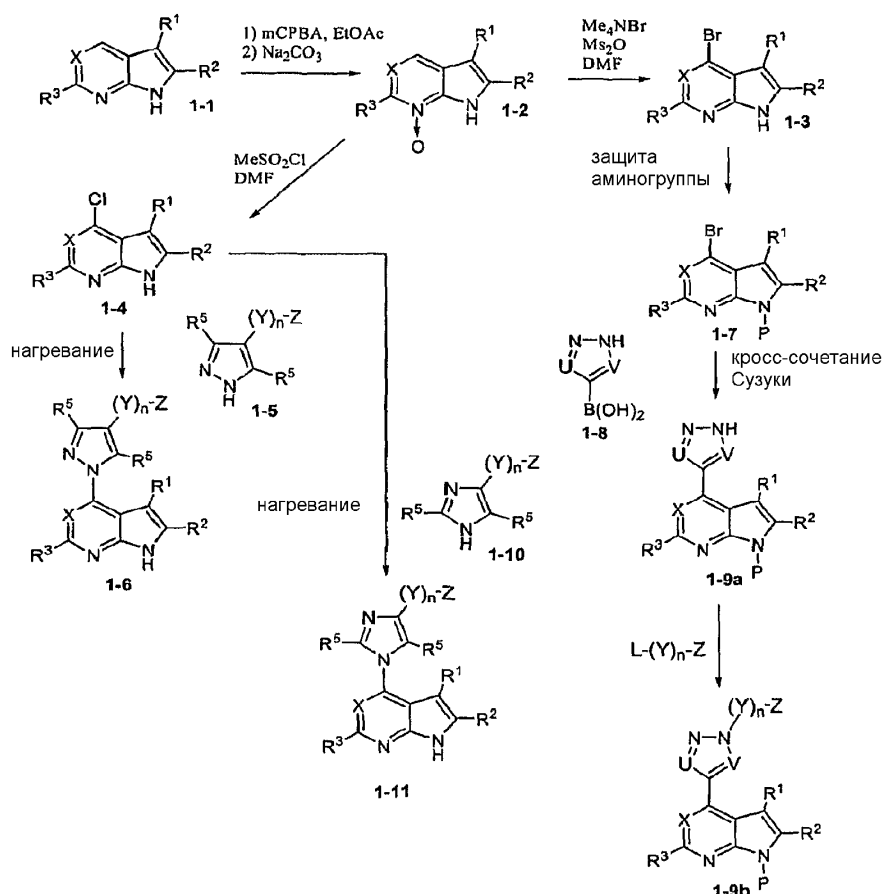


Схема 1

Как показано на схеме 2, пиразолосодержащие центральные фрагменты 2-3, 2-5 и 2-6 могут быть синтезированы исходя из бромзамещенного производного пиразола 2-1 (соединение 1-6 на схеме 1, где один из R⁵ представляет собой Br). Бромзамещенное производное пиразола 2-1 может быть сконденсировано с борсодержащими ароматическими производными, такими как ароматические бороновые кислоты 2-2 с использованием кросс-сочетания Сузуки, где Ar представляет собой арил или гетероарил, каждый из которых может быть необязательно замещенным одним или несколькими заместителями, такими как алкил, арил, CN, нитро, алкокси и т.д. Альтернативно алкен- или алкинсодержащее соединение, такое как алкенсодержащее соединение 2-5, может быть получено путем конденсации бромзамещенного производного пиразола 2-1 с ненасыщенным соединением, таким как алкен 2-4, в присутствии металлического катализатора, такого как хлорид бис(трифенилфосфин)палладия (II), где t может быть равным 0, 1, 2 и т.п.; и R может представлять собой заместитель, такой как алкил, арил, CN, нитро, алкокси и т.д. Алкеновая группа в соединении 2-5 может быть восстановлена путем гидрирования с образованием соответствующего соединения 2-6.

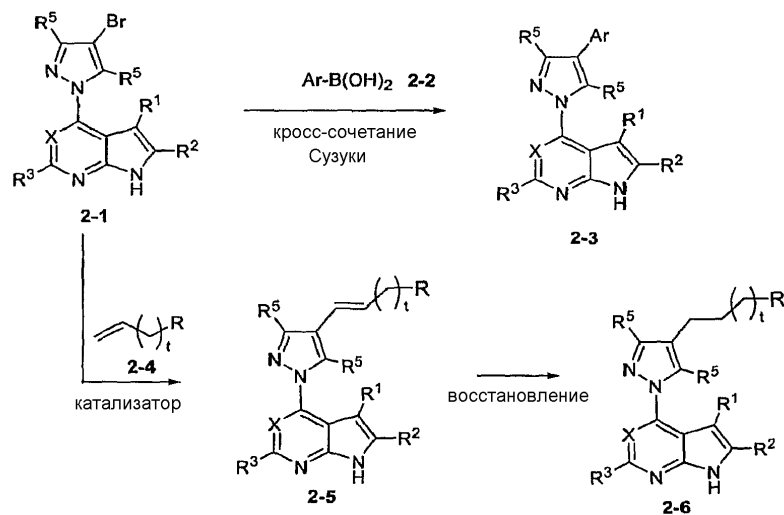


Схема 2

Как показано на схеме 3, имидазолсодержащие центральные фрагменты 3-7 могут быть синтезированы исходя из N-защищенного 4-бром-пирроло[2,3-d]пиридина или N-защищенного 4-бром-пирроло[2,3-b]пиримидина 3-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как {[2-(триметилсилил)этокси]метил} (SEM). Соединение 3-1 может быть подвергнуто взаимодействию с реактивом Гриньяра, таким как изопропилмагнийхлорид, для генерирования ароматического аниона путем ионного обмена. Последующее присоединение к аниону хлорацетилсодержащего соединения, такого как 2-хлор-N-метокси-N-метилацетамид 3-2, обычно будет приводить к хлорацетиловому производному 3-3. Производное 3-3 может быть подвергнуто взаимодействию с солью органической кислоты, такой как цезиевая соль R^5CO_2Cs , с получением соединения 3-4. В присутствии подходящего источника аммиака, такого как ацетат аммония, соединение 3-4 может взаимодействовать с аммиаком в подходящих условиях, таких как высокая температура с образованием имидазольного кольца соединения 3-5. Азот свободного амина в имидазольном производном 3-5 может быть подвергнут последующей модификации, такой как взаимодействие с соединением $X-(Y)_n-Z$, где X представляет собой уходящую группу, такую как хлор, бром или иод, таким образом, что образуется соединение 3-6. Защитная группа в соединении 3-6 может быть удалена с помощью подходящего способа в соответствии с природой защитной группы, приводя к соединению 3-7. Следует отметить, что если имеются функциональные группы, присутствующие в группе R, R^5 и $-(Y)_n-Z$, могут быть проведены дальнейшие модификации. Например, группа CN может быть гидролизována, с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта, который, в свою очередь, может быть модифицирован в дальнейшем. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации.

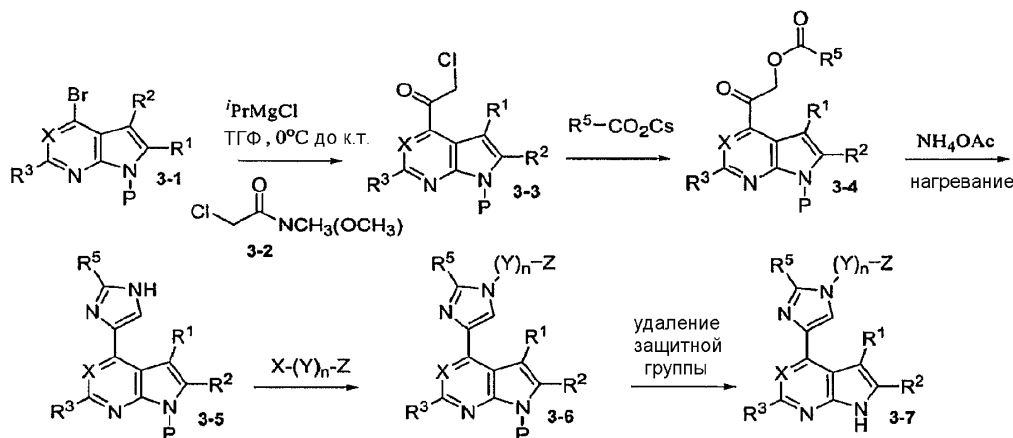


Схема 3

Как показано на схеме 4, тиазолсодержащие центральные фрагменты 4-3 могут быть синтезированы, исходя из N-защищенного хлорацетилового производного 4-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM. Соединение 4-1 может реагировать с тиоамидом 4-2 с образованием тиазольного кольца с последующим удалением защитной группы у аминного атома азота в пиррольном кольце посредством удаления группы Р с получением соединения 4-3. Различные тиомочевины 4-5 (эквиваленты соединения 4-2, где $-(Y)_n-Z$ представляет собой $NR'R''$; и R' и R'' представляют собой H, алкил, арил или т.п.; или R' и R'' вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикло-алкил), которые можно использовать для получения тиазольных соединений 4-3, могут быть получены из вторичных аминов 4-4. Вторичный амин 4-4 может взаимодействовать с 1,1'-тиокарбонилдиимидазолом, и полученное промежуточное соединение может далее взаимодействовать с аммиаком, давая тиомочевину 4-5.

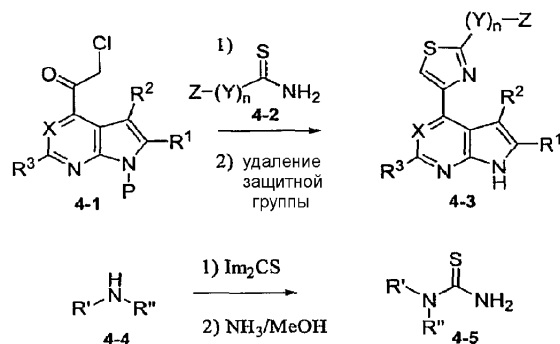


Схема 4

Как показано на схеме 5, тиазолсодержащие центральные фрагменты 5-5 могут быть синтезированы

исходя из тиазольного соединения 5-1. Соединение 5-1 может быть подвергнуто взаимодействию с алкилом металла, таким как *n*-буллитий, для генерирования ароматического аниона *in situ* посредством ионного обмена. Последующее присоединение триметилового эфира борной кислоты с последующим гидролизом обычно будет приводить к борной кислоте 5-2. Борная кислота 5-2 может вступать в кросс-сочетание по Сузуки с *N*-защищенным 4-бром-пирроло[2,3-*b*]пиридином или *N*-защищенным 4-бром-пирроло[2,3-*d*]пиримидином 5-3, где *P* представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM. Защитная группа *P* в продукте кросс-сочетания 5-4 может быть удалена с использованием подходящего способа в соответствии с природой защитной группы, приводя к соединению по изобретению 5-5.

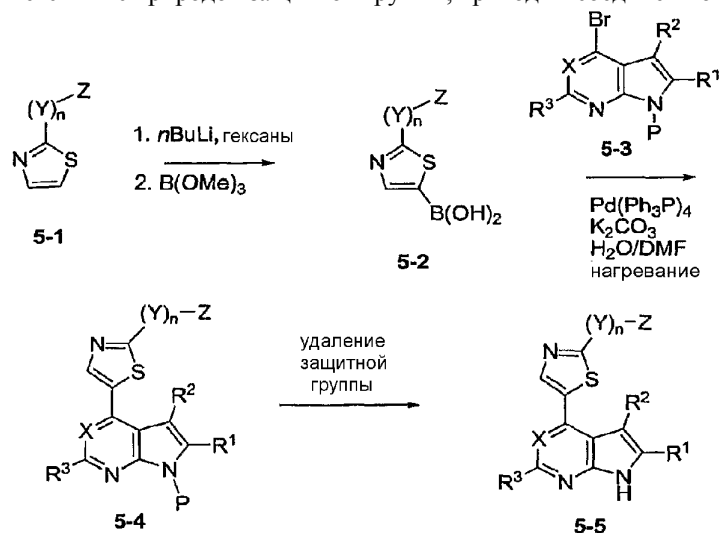


Схема 5

Как показано на схеме 6, пиразолсодержащие соединения 6-1 могут быть дополнительно модифицированы путем замещения пиразольной NH-группы подходящими реагентами. Например, соединение 6-1, в котором *P* представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM, может быть подвергнуто взаимодействию с *L*-(*Y*)_{*n*}-*Z*, где *L* представляет собой уходящую группу, такую как галоген, трифлат или т.п., с получением в основных условиях соединения 6-2. Если некоторые функциональные группы присутствуют в группах *Y* и/или *Z*, могут быть проведены дальнейшие модификации. Например, группа CN может быть гидролизována с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации.

Кроме того, соединение 6-1 может быть подвергнуто взаимодействию с алкеном 6-3 (где *R'* и *R''* могут представлять собой H, алкил, циклоалкил и т.п.; и *Z'* может представлять собой электроноакцепторную группу, такую как сложноэфирная группа или CN), приводя к получению соединения 6-4. Кроме того, можно провести замещение алкена 6-3 в альфа-положение (альфа относительно *Z'*) для образования замещенных производных продукта 6-4.

В соединениях 6-2 и 6-4 могут быть удалены защитные группы с использованием подходящих способов в соответствии с природой использованной защитной группы с получением из соответствующих незащищенных эквивалентов.

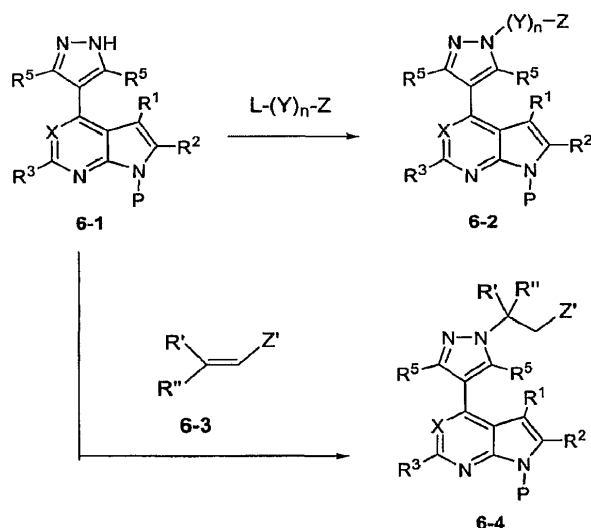


Схема 6

Как показано на схеме 7, бромпиразол содержащие соединения 7-1 могут быть далее модифицированы путем металлирования такими реагентами, как бутиллитий, и взаимодействия с электрофилами, такими как альдегиды, с получением спиртосодержащих соединений 7-2, в которых может быть удалена защитная группа с получения соединений по изобретению, имеющих формулу 7-3. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации, где это является подходящим.

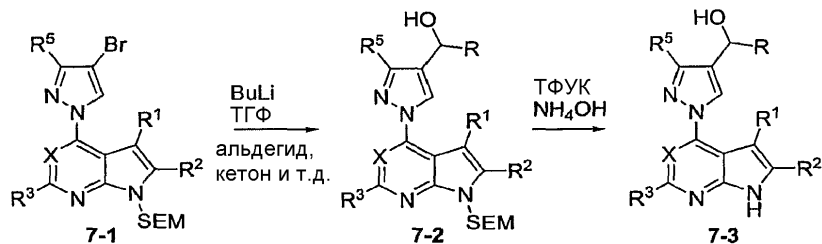


Схема 7

Как показано на схеме 8, пиразолсодержащие соединения 8-4 и 8-5 могут быть получены взаимодействием N-защищенного бромидного соединения 8-1 с гидразином в подходящем растворителе, таком как N,N-диметилформамид (ДМФ), с получением гидразинового промежуточного соединения 8-2. Гидразиновое промежуточное соединение 8-2 подвергают взаимодействию с подходящим образом замещенным 1,3-бис-альдегидом, таким как 8-3, с получением пиразолсодержащего соединения 8-4. Если некоторые функциональные группы присутствуют в группах Y и/или Z, могут быть проведены дальнейшие модификации. Например, группа CN может быть гидролизována с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации.

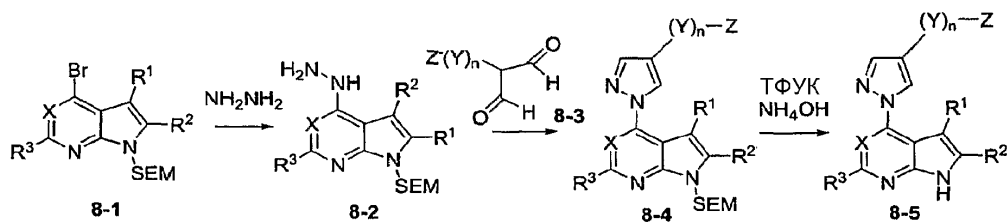


Схема 8

Как показано на схеме 9, соединение 1,2,4-оксадиазола 9-6 может быть получено из N-защищенного бромидного соединения 9-1 при обработке его цианидом цинка в ДМФ в присутствии катализатора, такого как бис(трибутил)палладий, с получением N-защищенного циано-соединения 9-2. N-гидрокарбоксимидное соединение 9-3 может быть получено путем нагревания N-защищенного циано-соединения 9-2 с гидрохлоридом гидросиламина в подходящем растворителе, таком как этанол, в присутствии основания, такого как карбонат калия, при температуре ниже температуры кипения растворителя. N-защищенное соединение 1,2,4-оксадиазола может быть получено путем обработки N-гидрокарбоксимидного соединения 9-3 подходящим образом замещенным хлорангидридом кислоты 9-4 в растворителе, таком как пиридин, при температуре, достаточной для завершения замыкания кольца. Если некоторые функциональные группы присутствуют в группах Y и/или Z, могут быть проведены дальнейшие модификации. Например, группа CN может быть гидролизována с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации, где это является подходящим.

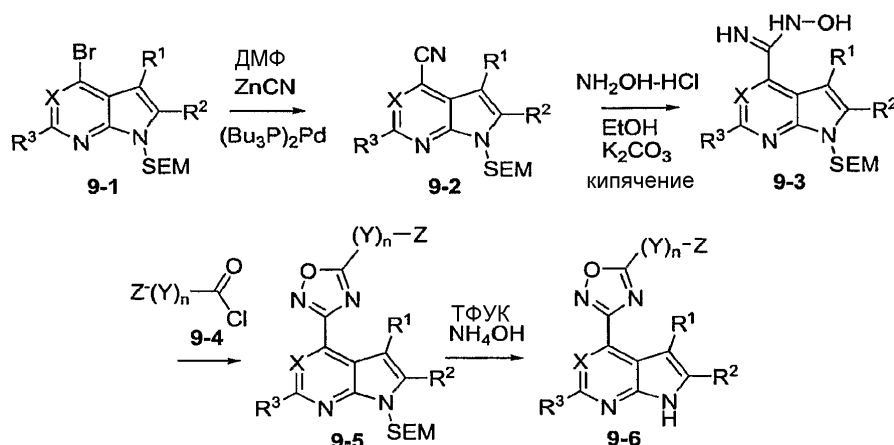


Схема 9

Как показано на схеме 10, 3- и 4-арилпиразоло-соединения 10-9 могут быть получены путем взаимодействия соответствующего 3-арилпиразоло-соединения 10-4 или 4-арилпиразоло-соединения 10-7 с подходящим замещенным бромидным соединением 10-8, как описано ранее. 3-Арилпиразольное соединение 10-4 может быть получено путем взаимодействия замещенной подходящим образом арильной группы, содержащей галоген, такой как бром, или трифлат с N-защитненной бороновой кислотой или сложным эфиром бороновой кислоты соединения пиразола 10-2 в условиях типа условий Сузуки, известных в литературе. N-защитная группа в 10-3 может быть удалена в условиях, описанных ранее и известных в литературе для удаления группы, такой как SEM.

4-Арилпиразольные соединения 10-7 могут быть получены путем взаимодействия подходящим образом замещенного соединения ацетофенона 10-5 с ацеталем ДМФ при повышенной температуре, с получением диметиламино-соединения 10-6. 4-Арилпиразоло-соединения 10-7 могут быть получены путем обработки диметиламино-соединения 10-6 с гидразином в растворителе, таком как этанол.

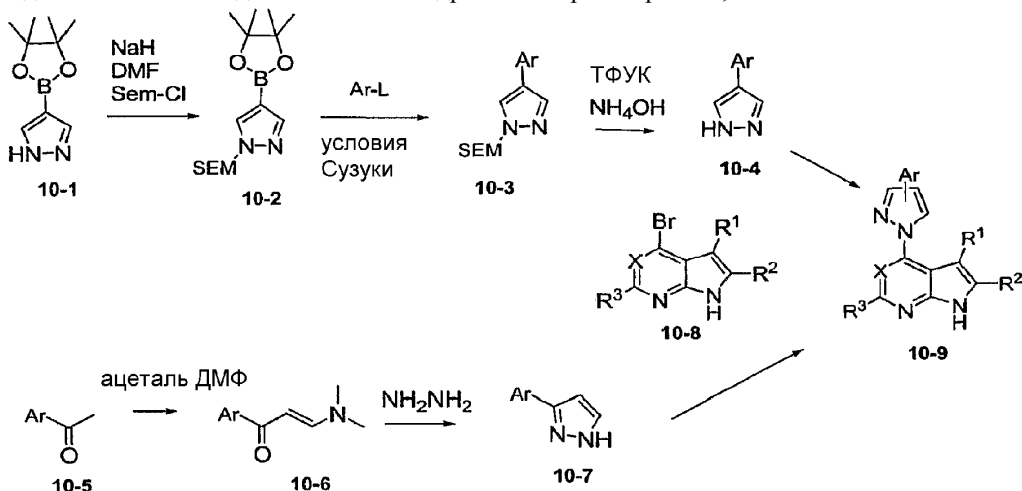


Схема 10

Как показано на схеме 11, замещенное соединение пиразола 11-5 может быть получено множеством способов, таких как удаление защитной группы, например, SEM, в соединении 11-4 в ранее описанных условиях. Например, замещенное N-защитненное соединение пиразола 11-4 может быть получено путем взаимодействия промежуточного N-защитненного соединения пиразола 11-3 с подходящим образом замещенным алкилгалогенидом, бензилгалогенидом, алкилсульфонатами, например, мезилатом или тозилатом или при других подходящих уходящих группах L, в подходящем растворителе, таком как MeCN, ДМФ или тетрагидрофуран (ТГФ), в присутствии основания, такого как гидрид натрия или карбонат цезия. N-арилпиразол 11-4 (где Y является ароматической группой) может быть получен путем взаимодействия промежуточного пиразола 11-3 с подходящим образом замещенной арилбороновой кислотой в растворителе, таком как дихлорметан (ДХМ) в присутствии ацетата меди и пиридина. Альтернативно N-арилпиразол 11-4 (где Y является ароматической группой) может быть получен путем взаимодействия промежуточного пиразола 11-3 с подходящим образом замещенным арилфторидом в растворителе, таком как ДМФ, при повышенной температуре. Или замещенные соединения пиразола 11-4 (где Z представляет собой группу, такую как нитрильная или сложноэфирная, и Y имеет по крайней мере два углерода) могут быть получены путем взаимодействия промежуточного пиразола 11-3 с подходящим образом замещенным акрилатом, акрилонитрилом или другими акцепторами типа Михаэля в растворителе,

таким как ДМФ, в присутствии основания, такого как 1,8-диазабикло[5,4,0]ундец-7-ен (ДБУ) или триэтиламин (ТЕА), и при температуре ниже температуры кипения растворителя. Если некоторые функциональные группы присутствуют в группах Y и/или Z, могут быть проведены дальнейшие модификации. Например, группа CN может быть гидролизвана с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта. Специалисту в данной области будут понятны подходящие последующие модификации, где это является подходящим.

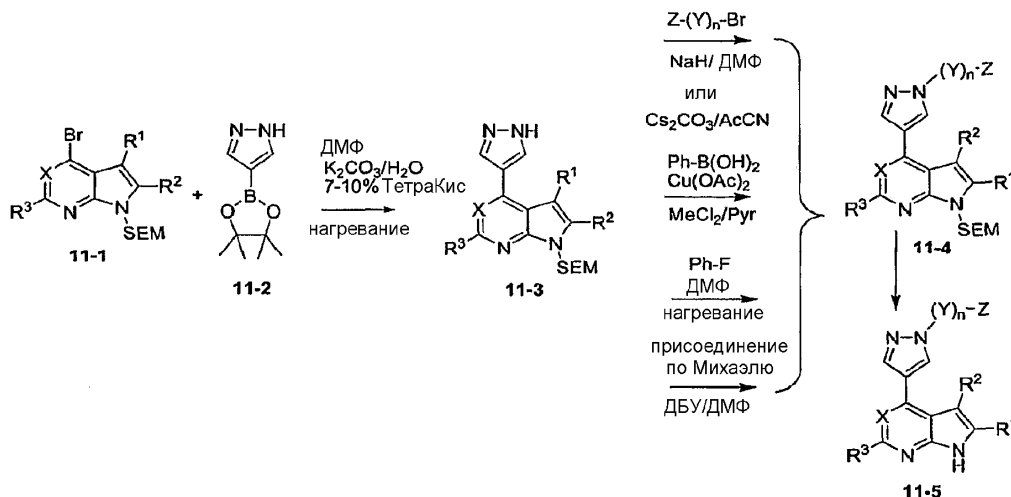


Схема 11

Как показано на схеме 12, пиразол 12-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM, и может быть подвергнут взаимодействию с алкиносодержащим сопряженным акцептором, таким как 12-2; и где Z представляет собой электроноакцепторную группу (например, -CN) необязательно в присутствии основания (ДБУ или K_2CO_3 и т.п.) в растворителе, таком как ДМФ или MeCN, при различной продолжительности времени для получения олефинсодержащих аддуктов 12-3. В соединениях, представленных формулой 12-3, может быть удалена защитная группа с использованием подходящих способов в соответствии с природой использованной защитной группы, с получением соединений по изобретения 12-4.

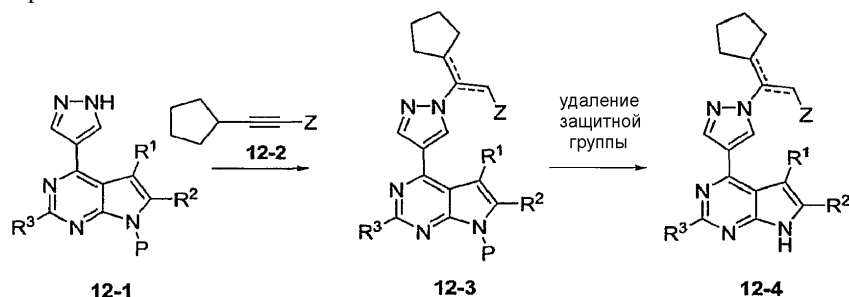


Схема 12

Как показано на схеме 13, оксазол- или тиазолсодержащие соединения 13-6 могут быть получены исходя из N-защитненного 4-хлор-пирроло[2,3-d]пиримидина 13-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM. Оксазол- или тиазолсодержащие продукты формулы 13-2 могут быть получены катализируемой палладием конденсацией 13-1 с оксазолом или тиазолом. Соединение 13-2 может быть подвергнуто взаимодействию с алкилом металла, таким как n-бутиллитий, для генерирования ароматического аниона in situ, к которому могут быть присоединены при низких температурах (предпочтительно между -78 и 0°C) производные карбоновых кислот 13-3 (где $W=N(\text{Me})(\text{OMe})$, когда $X'=S$; и $W=Cl$, когда $X'=O$), в присутствии других вспомогательных добавок, таких как хлорид цинка или иодид меди (I), когда $X'=O$, в подходящем растворителе, таком как ТГФ, для образования множества кетонов 13-4. Кетоны 13-4 могут быть подвергнуты взаимодействию со множеством реагентов, таких как диэтил(цианометил)фосфонат или триэтилфосфоноацетат, в присутствии основания, такого как трет-бутоксид калия, с последующим восстановлением (включая гидрирование или медь-гидрид катализируемое восстановление) или с реагентами, такими как тозилметилизоцианид, для получения продуктов формулы 13-5, где Z представляет собой электроноакцепторную группу, такую как сложноэфирная или -CN. Если некоторые функциональные группы присутствуют в группе R или они охватываются Z, могут быть проведены дальнейшие модификации и такие подходящие дальнейшие модификации будут очевидны для специалиста в данной области. В соединениях 13-5 может быть удалена защитная

группа с использованием подходящих способов в соответствии с природой использованной защитной группы, с получением соответствующих незащищенных эквивалентов 13-6.

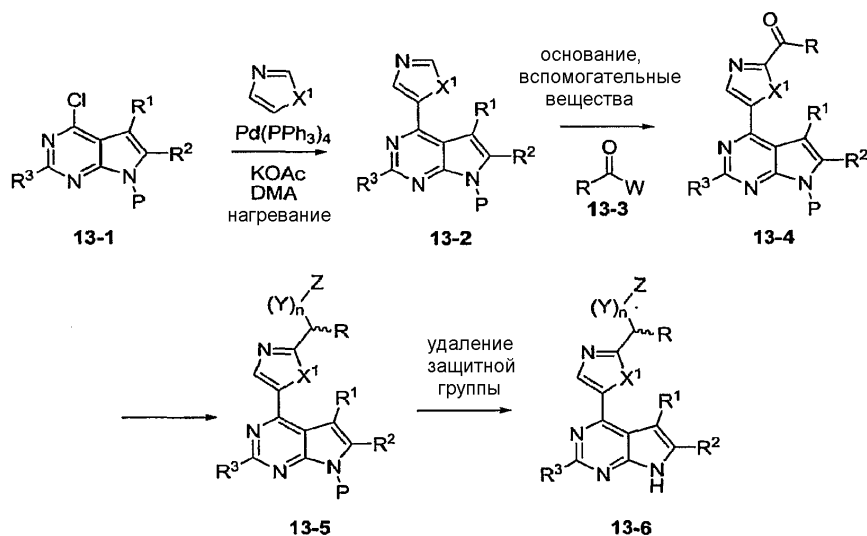


Схема 13

Как показано на схеме 14, аминотиазолсодержащие центральные фрагменты 14-5 могут быть синтезированы исходя из тиазолсодержащего центрального фрагмента 14-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM. Соединение 14-1 может быть обработано алкилом металла, таким как *n*-бутиллитий, для генерирования ароматического аниона *in situ*, к которому может быть добавлен подходящий источник электрофильного галогена, такой как четырехбромистый углерод, с получением галогенированного производного 14-2. Защитная группа Р в 14-2 может быть удалена с использованием подходящего способа в соответствии с природой использованной защитной группы, с получением продукта 14-3. Соединение 14-3 может быть подвергнуто взаимодействию с аминами 14-4 при повышенной температуре в подходящем растворителе, таком как ДМФ, с получением соединения по изобретению 14-5.

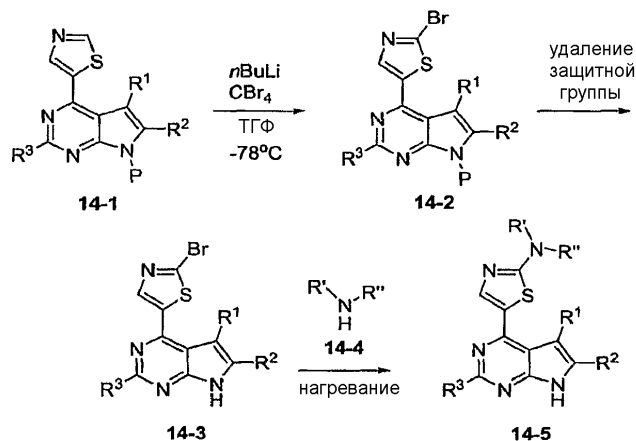


Схема 14

Как показано на схеме 15, пирролсодержащие центральные фрагменты 15-4 могут быть синтезированы исходя из N-защищенного 4-хлор-пирроло[2,3-*d*]пиримидина 15-1, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как DEM (диэтоксиметил). Соединение 15-1 может быть подвергнуто взаимодействию с 1-(триизопропилсил)пиррол-3-бороновой кислотой в условия кросс-сочетания по Сузуки с получением одновременно пиррольного центрального фрагмента с удаленной защитной группой 15-2. Пирролсодержащие соединения 15-2 могут быть подвергнуты взаимодействию с алкенами 15-3, содержащими электроноакцепторную группу Z (такую как -CN) в присутствии подходящего основания (такого как ДБУ) при различных температурах (например, между комнатной температурой и 40°C) с последующей *in situ* или отдельной стадией удаления защитной группы, которая является подходящей для выбранной защитной группы, с получением соединений по изобретению 15-4.

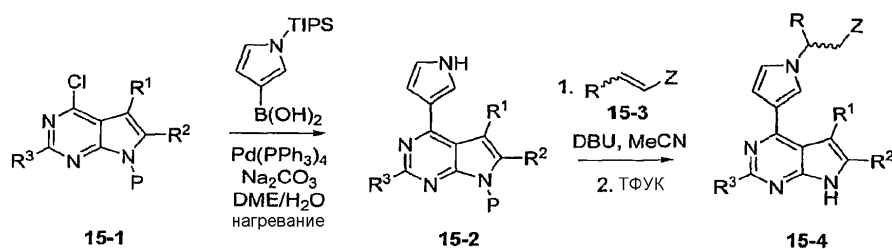


Схема 15

Как показано на схеме 16, замещенное соединение пиразола, содержащее сульфоновую или сульфоксидную функциональную группу, как в 16-6, может быть получено множеством способов, например, исходя из подходящим образом замещенного бромтиофенильного простого эфира 16-2. Простой тиозфир 16-2 легко может быть получен алкилированием тиофенола 16-1 алкилгалогенидом, мезилатом или т.п. с использованием основания, такого как ДБУ, карбоната калия или гидрида натрия. Циннамилнитрил 16-3 может быть получен реакцией Хека или подобным способом с использованием ацетата палладия и трифенилфосфина в ДМФ при подходящей температуре с использованием акрилонитрила. SEM-защищенное промежуточное соединение 16-4 может быть получено способами, описанными ранее для осуществления присоединения по Михаэлю пиразольного центрального фрагмента к подходящим образом замещенному α - β -ненасыщенному нитрилу, такому как 16-3. Сульфоксид 16-5, где $n=1$, и сульфон 16-5, где $n=2$, могут быть получены способами, хорошо известными в литературе для окисления простого тиозфира 16-4, как, например, с использованием *m*-хлорпербензойной кислоты (МСПВА) в ДХМ. Конечные соединения 16-6, где $n=0$, 1 или 2, могут быть получены способами, описанными ранее для удаления защитной группы SEM. Альтернативно окисление серы может быть проведено для соединений 16-2 или 16-3 в зависимости от совместимости замещения на схеме синтеза.

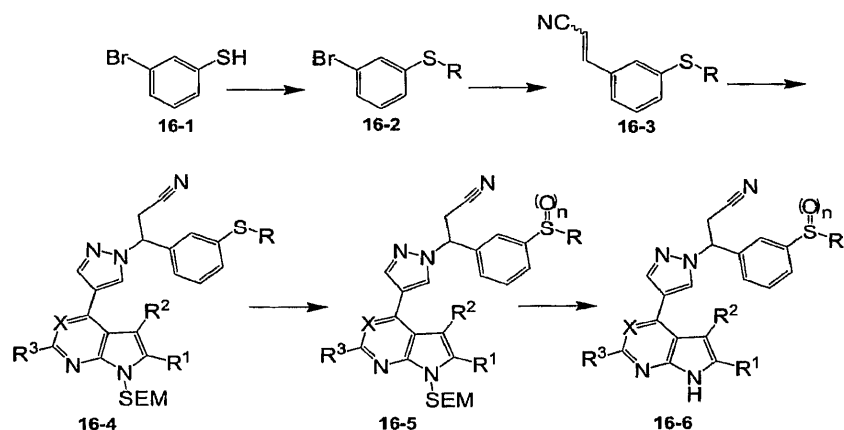


Схема 16

Также, как показано на схеме 17, замещенные соединения пиразола, содержащие сульфонамидную функциональную группу, такие как 17-6, могут быть получены множеством способов. Например, можно исходить из подходящим образом замещенного бромфенилсульфонамида 17-2, где R^c и R^d являются подходящими заместителями. Соединение 17-2 легко может быть получено реакцией бромфенилсульфонилхлорида 17-1 и подходящим образом замещенного амина, такого как анилин или первичный или вторичный амин, в подходящем растворителе, таком как ДХМ, ТГФ или пиридин. Циннамилнитрил 17-3 может быть получен реакцией Хека или подобным способом с использованием ацетата палладия и трифенилфосфина в ДМФ при подходящей температуре с использованием акрилонитрила. Конечные соединения 17-6, в которых R^c и R^d являются частью сульфонамидной функциональной группы, могут быть получены способами, аналогичными описанным для схемы 16, исходя из циннамилнитрила 17-3.

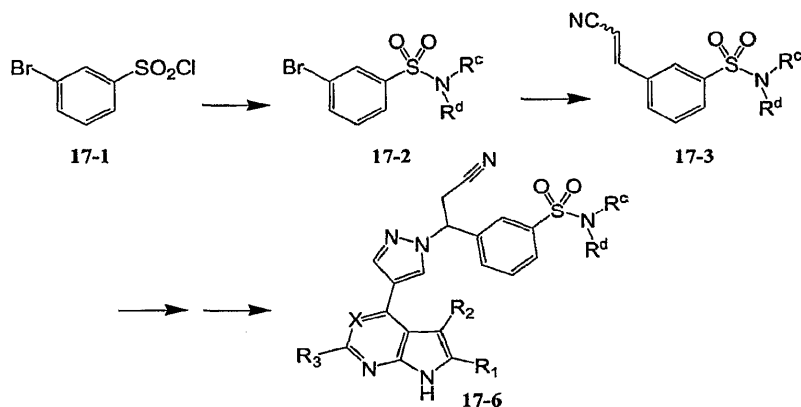


Схема 17

Также, как показано на схеме 18, замещенные соединения пиразола, содержащие альфа-аллильную цикlopентилметиленовую функциональную группу, такие как 18-8, могут быть получены, например, путем взаимодействия пиразола 18-3, где Р представляет собой подходящую защитную группу амина, такую как SEM, и Х представляет собой N или С, с цикlopентилакрилатным сложным эфиром 18-4 с образованием сложного эфира 18-5. Сложный эфир 18-5 затем может быть восстановлен в соответствующий альдегид 18-6, например, с помощью двухстадийного способа, включающего восстановление до спирта и селективное окисление промежуточного спирта в альдегид, например, путем окисления по Сверну. Альдегид 18-6 может быть преобразован в соответствующий олефин 18-7, например, реакцией с реагентом Виттига. В олефине 18-7 затем может быть удалена защитная группа, как описано ранее, с получением соединения формулы 18-7. Промежуточное соединение 18-4 может быть получено, например, как показано на схеме 18, исходя из цикlopентилальдегида.

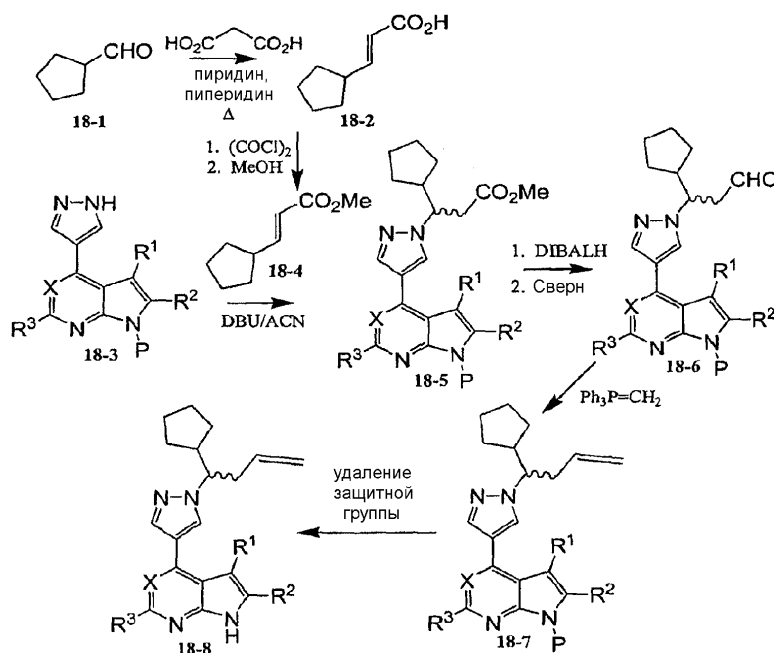


Схема 18

Также, как показано на схеме 19, цианоганидиновое производное 19-6 может быть получено исходя из замещенных соединений пиразола, таких как пиразол 18-3, где Р представляет собой подходящую защитную группу и Х представляет собой N или С. Соединение 18-3 может, например, быть подвергнуто взаимодействию с олефином 19-1, полученным реакцией Хорнера-Вудсворта-Эммонса соответствующего Вос-защитненного пиперидона в присутствии подходящего основного катализатора в подходящем растворителе, образуя 19-2. В промежуточном соединении 19-2 удаляют защитную группу с использованием подходящей реакции для удаления защитной группы, получая соединение амина 19-3, которое затем реагирует селективно с цианоимидокарбонатным реагентом, таким как 19-4, в полярном растворителе при подходящей температуре, например, примерно 20°C, давая цианоимидокарбамат, такой как 19-5, который затем может быть подвергнут взаимодействию с любым из множества аминов при повышенной температуре с получением продукта 19-6.

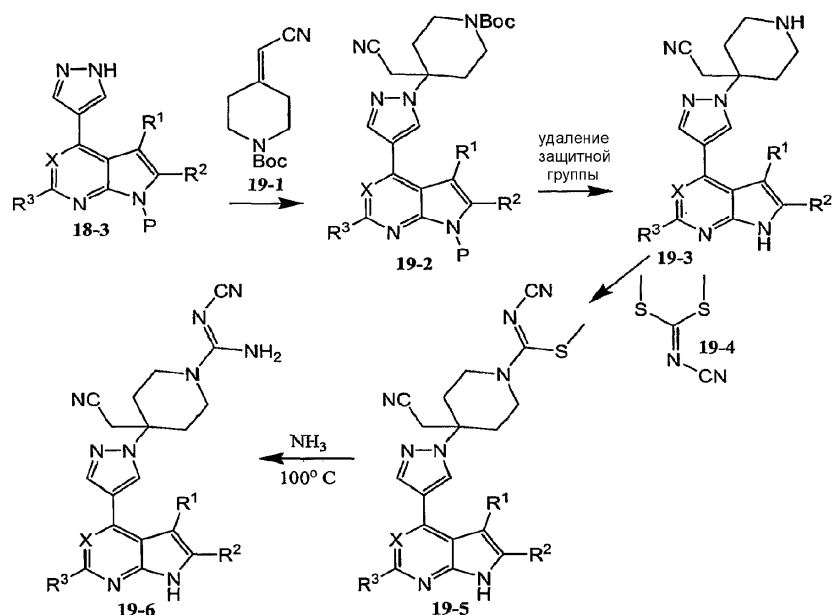


Схема 19

Промежуточные соединения 20-5 и 20-6 могут быть получены с использованием множества способов, известных в литературе, например способов, представленных в общем виде на схеме 20. Промежуточное соединение 20-3 может быть получено реакцией соединения альдегида 20-1 с подходящим образом замещенным реагентом Виттига или реагентами Хорнера-Эммонса с образованием α - β -незамещенного сложного эфира 20-3. Альтернативно 20-3 может быть получен реакцией типа реакции Хека подходящим образом замещенного арилбромида 20-2 и акрилового сложного эфира в присутствии палладиевого реагента при повышенной температуре. Соединение 20-4 может быть получено способами, описанными ранее, для присоединения типа присоединения Михаэля подходящим образом замещенного пиррола 18-3 к α - β -ненасыщенному сложному эфиру 20-3. Альдегидное соединение 20-5 может быть получено восстановлением сложноэфирного соединения 20-4 с использованием реагентов, таких как диизобутилалюминийгидрид при низкой температуре, такой как примерно -78°C , в подходящем растворителе. Альдегидное соединение 20-5 может быть в дальнейшем восстановлено в соответствующее соединение спирта 20-6 с использованием реагентов, таких как боргидрид натрия в метаноле. Альтернативно соединение спирта 20-6 может быть получено непосредственно восстановлением сложного эфира 20-4 с использованием реагентов, таких как литийалюминийгидрид в подходящем растворителе и при подходящей температуре.

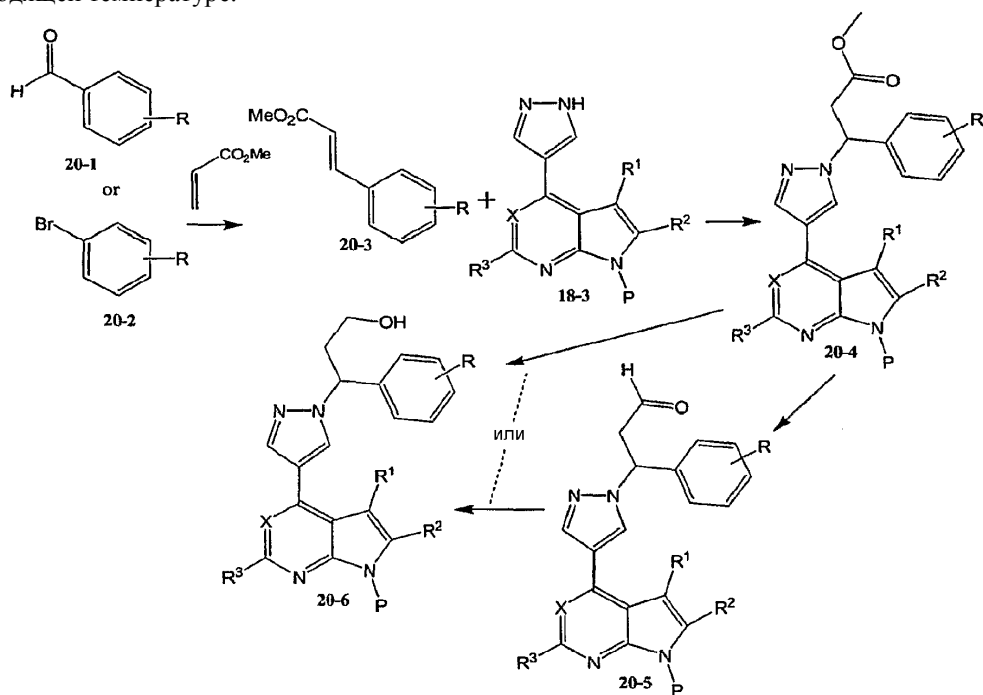
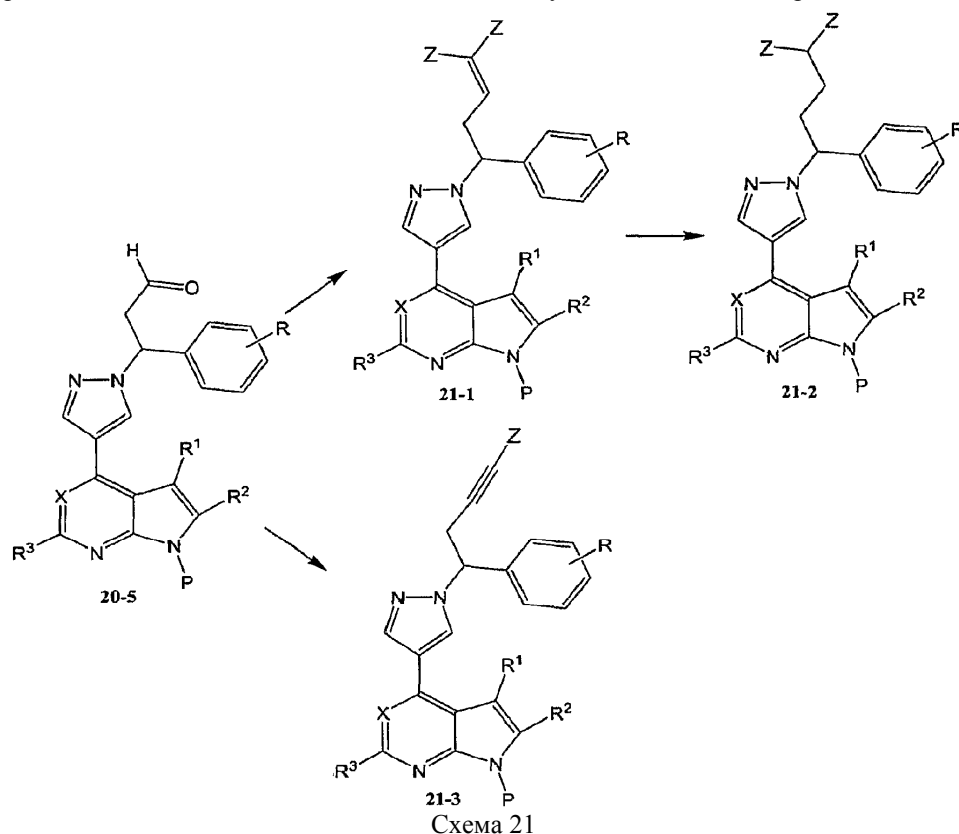


Схема 20

Соединения 21-1 и 21-3 могут быть получены с использованием множества способов, известных в литературе, например способов, представленных в общем виде на схеме 21. Олефиновое соединение 21-1 может быть получено взаимодействием альдегида 20-5 с подходящим образом замещенным реагентом Виттига или реагентами Хорнера-Эммонса с использованием основания, такого как гидрид натрия или трет-бутоксид калия, в подходящем растворителе, при проведении при повышенной температуре. Олефиновое соединение 21-1 может быть восстановлено до насыщенного соединения 21-2, например, с использованием условий гидрирования, хорошо известных в литературе, например гидрирования в присутствии палладия на угле в таком растворителе, как метанол. Ацетиленовое соединение 21-3 может быть получено способами, описанными ранее, или реакцией альдегида 20-5 с реагентом Бестманна-Охира (Quesada, E. et al., *Tetrahedron*, 62 (2006), 6673-6680), как описано в литературе. Альтернативно соединение спирта 20-6 на схеме 20 может быть окислено в альдегид 20-5 с использованием способов, хорошо известных в литературе, например, в условиях окисления Сверна, с последующей реакцией с реагентом Бестманна-Охира, где данная последовательность реакций может быть проведена в виде "one-pot" двух-стадийной реакционной последовательности или в виде двух отдельных стадий реакции.



Соединения 22-1 и 22-3 могут быть получены с использованием множества способов, известных в литературе, например способов, представленных в общем виде на схеме 22. Кислородзамещенное соединение 22-1 может быть получено, например, взаимодействием с подходящим образом замещенным спиртом 20-6 (на схеме 20), где X представляет собой N или C и P представляет собой защитную группу, с основанием, таким как гидрид натрия, и подходящим агентом, таким как алкилиодид, карбонат или изотиоцианат, проведенным в подходящем растворителе и при подходящей температуре. Альтернативно спиртовая группа в соединении 20-6 может быть преобразована в уходящую группу LG, как в соединении 22-2, где уходящая группа может представлять собой бромид или мезилат. Соединение 22-2 служит субстратом для последующей реакции с нуклеофилом, таким как, например, этоксид натрия (Nuc=этокси).

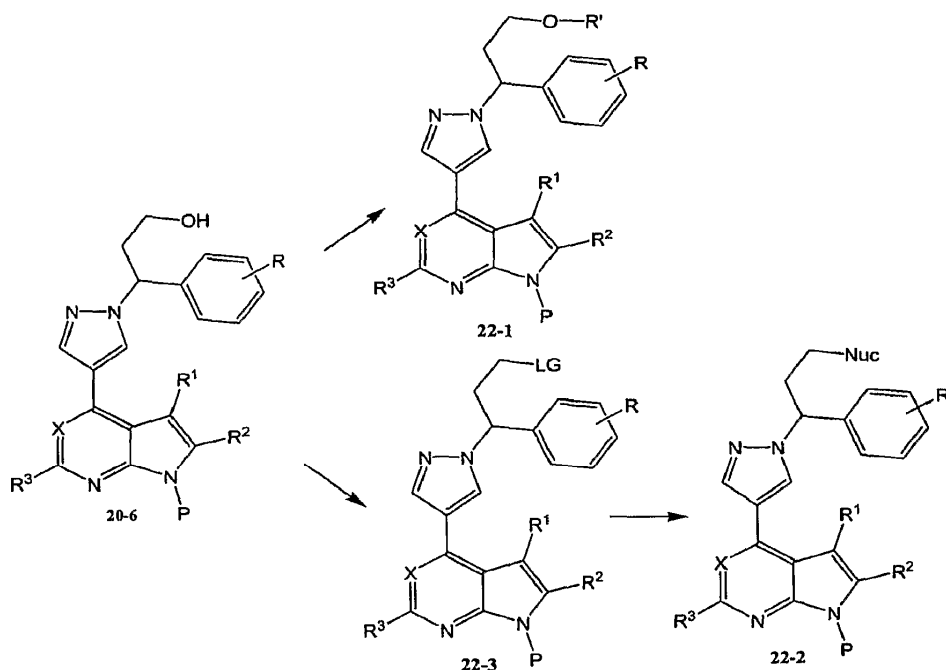


Схема 22

Следует отметить, что на всех описанных схемах, если функциональные группы присутствуют в одной из групп заместителей, такой как Y, Z, R, R¹, R², R⁵ и т.д., могут быть проведены дальнейшие модификации, если это является подходящим и желательным. Например, группа CN может быть гидролизована с получением амидной группы, карбоновая кислота может быть преобразована в сложный эфир, который, в свою очередь, может быть восстановлен до спирта. В другом примере ОН-группа может быть преобразована в лучшую уходящую группу, такую как мезилат, которая, в свою очередь, является пригодной для нуклеофильного замещения, например, группой CN. Такие последующие модификации будут очевидны для специалиста в данной области.

Методы.

Соединения по изобретению могут модулировать активность одной или нескольких Янус-киназ (JAK). Подразумевается, что термин "модулировать" означает способность увеличивать или уменьшать активность одного или нескольких членов JAK семейства киназ. Соответственно соединения по изобретению можно использовать в способах модулирования JAK посредством контактирования JAK с одним или несколькими описанными здесь соединениями или композициями. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению могут действовать как ингибиторы одной или нескольких JAK. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению могут действовать, стимулируя активность одной или нескольких JAK. В следующих вариантах осуществления соединения по изобретению можно использовать для модулирования активности JAK у индивидуума, нуждающегося в модулировании рецептора, путем введения модулирующего количества соединения формулы Ia, Ib или Ic.

Киназы JAK, с которыми связываются и/или которые модулируют настоящие соединения, включают любой член семейства JAK. В некоторых вариантах осуществления JAK представляет собой JAK1, JAK2, JAK3 или TYK2. В некоторых вариантах осуществления JAK представляет собой JAK1 или JAK2. В некоторых вариантах осуществления JAK представляет собой JAK2. В некоторых вариантах осуществления JAK представляет собой JAK3.

Соединения по изобретению могут быть селективными. Под термином "селективный" подразумевается, что соединение связывается или ингибирует JAK с большей аффинностью или эффективностью соответственно по сравнению с по крайней мере одной другой JAK. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению являются селективными ингибиторами JAK1 или JAK2 по сравнению с JAK3 и/или TYK2. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению являются селективными ингибиторами JAK2 (например, относительно JAK1, JAK3 и TYK2). Без связи с какой-либо теорией, поскольку ингибиторы JAK3 могут приводить к иммуноподавляющему действию, соединение, которое является селективным в отношении JAK2 по сравнению с JAK3 и которое используется для лечения рака (такого как множественная миелома, например), может давать дополнительное преимущество как имеющее меньшее иммуноподавляющее побочное действие. Селективность может быть по крайней мере примерно 5-кратной, 10-кратной, по крайней мере примерно 20-кратной, по крайней мере примерно 50-кратной, по крайней мере примерно 100-кратной, по крайней мере примерно 200-кратной, по крайней мере примерно 500-кратной или по крайней мере примерно 1000-кратной. Селективность может быть измерена способами, которые являются рутинными для данной области. В некоторых вариантах осуществ-

ствления селективность может быть протестирована для K_m каждого фермента. В некоторых вариантах осуществления селективность соединений по изобретению в отношении JAK2 по сравнению с JAK3 может быть определена с помощью клеточной концентрации АТФ.

Другой аспект настоящего изобретения охватывает способы лечения JAK-связанного заболевания или нарушения у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы соединения по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции. JAK-связанное заболевание может включать любое заболевание, нарушение или состояние, которое непосредственно или косвенно связано с экспрессией или активностью JAK, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности. JAK-связанное заболевание также может включать любое заболевание, нарушение или состояние, которое может быть предотвращено, уменьшено или излечено путем модулирования активности JAK.

Примеры JAK-связанных заболеваний включают заболевания иммунной системы, включая, например, отторжение органа-трансплантата (например, отторжение аллотрансплантата или болезнь "трансплантат против хозяина").

Следующие примеры JAK-связанных заболеваний включают аутоиммунные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, диабет типа I, волчанка, псориаз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, бульбоспинальный паралич, иммуноглобулиновые невропатии, аутоиммунные нарушения щитовидной железы и т.п. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунное буллезное кожное заболевание, такое как обыкновенная пузырчатка (ОП) или буллезный пемфигоид (БП).

Следующие примеры JAK-связанных заболеваний включают аллергические состояния, такие как астма, пищевые аллергии, атопический дерматит и ринит. Другие примеры JAK-связанных заболеваний включают вирусные заболевания, такие как вирус Эпштейна-Барра (EBV), гепатит В, гепатит С, HIV, HTLV 1, вирус Варицелла-Зостер (VZV) и вирус папилломы человека (HPV).

Дополнительные примеры JAK-связанных заболеваний или состояний включают кожные заболевания, такие как псориаз (например, псориаз обыкновенный), атопический дерматит, кожная сыпь, раздражение кожи, повышенная аллергическая реакция кожи (например, контактный дерматит или аллергический контактный дерматит). Например, некоторые вещества, включая некоторые фармацевтические препараты, при наружном нанесении могут вызвать кожную реакцию. В некоторых вариантах осуществления, совместное введение или последовательное введение по крайней мере одного ингибитора JAK по изобретению вместе с агентом, вызывающим нежелательную аллергическую реакцию, может быть полезно при лечении таких нежелательных аллергических реакций или дерматитов. В некоторых вариантах осуществления, кожное нарушение подвергают лечению путем наружного применения по крайней мере одного ингибитора JAK по изобретению.

В следующих вариантах осуществления JAK-связанное заболевание представляет собой рак, включая характеризуемый твердыми опухолями (например, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, саркома Капоши, болезнь Кастельмана, меланома и т.д.), гематологические виды рака (например, лимфома, лейкомия, такая как острая лимфобластная лейкомия или множественная миелома) и рак кожи, такой как кожная Т-клеточная лимфома (CTCL) и кожная В-клеточная лимфома. Примеры кожных Т-клеточных лимфом включают синдром Сезария и грибовидный микоз.

JAK-связанные заболевания могут дополнительно включать те, которые характеризуются экспрессией мутантной JAK2, таких как имеющие по крайней мере одну мутацию в псевдокиназном домене (например, AK2V617F).

JAK-связанные заболевания могут дополнительно включать миелопролиферативные нарушения (MPDs), такие как болезнь Вакса-Ослера (PV), идиопатическая тромбоцитопения (ET), миелоидная метаплазия с миелофиброзом (MMM), хроническая миелогенная лейкомия (CML), хроническая миеломоноцитная лейкомия (CMML), гиперэозинофильный синдром (HES) или системное заболевание тучных клеток (SMCD) и т.п.

Другие JAK-связанные заболевания включают воспаление и воспалительные заболевания. Примеры воспалительных заболеваний включают заболевания глаз (например, воспаление радужной оболочки глаза, увеит, склерит, конъюнктивит или родственное заболевание), воспалительные заболевания дыхательных путей (например, верхних дыхательных путей, включая нос и носовые пазухи, такие как ринит или синусит, или нижних дыхательных путей, включая бронхит, хроническое обструктивное заболевание легких и т.п.), воспалительную миопатию, такую как миокардит, и другие воспалительные заболевания.

Описанные здесь ингибиторы JAK, кроме того, можно использовать для лечения ишемических реперфузионных повреждений, или заболевания, или состояния, относящегося к воспалительному ишемическому случаю, такому как инсульт или остановка сердца. Описанные здесь ингибиторы JAK, кроме того, можно использовать для лечения анорексии, кахексии или утомляемости, такой как возникающая при раке или связанная с ним. Описанные здесь ингибиторы JAK, кроме того, можно использовать для лечения рестеноза, склеродермии или фиброза. Описанные здесь ингибиторы JAK, кроме того, можно ис-

пользовать для лечения состояний, связанных с гипоксией или астроглиомой, таких как диабетическая ретинопатия, рак или нейродегенерация (см., например, Dudley, A.C. et al., *Biochem. J.*, 2005, 390(Pt. 2):427-36; и Sriram, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(19):19936-47, epub, 2004, Mar 2).

Для использования в данном описании термин "контактирование" относится к совместному появлению указанных фрагментов в системе *in vitro* или в системе *in vivo*. Например, "контактирование" JAK с соединением по изобретению включает введение соединения по настоящему изобретению индивидууму или пациенту, такому как человек, имеющему JAK, а также, например, введение соединения по изобретению в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий JAK.

Для использования в данном описании термин "индивидуум" или "пациент", используемые взаимозаменяемо, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно к мышам, крысам, другим грызунам, кроликам, собакам, кошкам, свиньям, крупному рогатому скоту, овцам, лошадям или приматам и наиболее предпочтительно к человеку.

Для использования в данном описании выражение "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного соединения или фармацевтического агента, которое вызывает биологическую или медицинскую ответную реакцию ткани, системы, животного, индивидуума или человека, который рассматривается исследователем ветеринаром, лечащим доктором или другим клиницистом, что включает одно или несколько из следующего:

(1) профилактика заболевания, например предотвращение заболевания, состояния или нарушения, у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, состоянию или нарушению, но который еще не подвержен или у которого еще не проявляется патология или симптоматика заболевания;

(2) подавление заболевания, например подавление заболевания, состояния или нарушения, у индивидуума, который подвержен или у которого проявляется патология или симптоматика заболевания, состояния или нарушения (т.е. остановка дальнейшего развития патологии и/или симптоматики); и

(3) облегчение протекания заболевания, например облегчение протекания заболевания, состояния или нарушения, у индивидуума, который подвержен или у которого проявляется патология или симптоматика заболевания, состояния или нарушения (т.е. обратное направление патологии и/или симптоматики).

Комбинированная терапия.

Один или несколько дополнительных фармацевтических агентов, таких как, например, химиотерапевтические препараты, противовоспалительные агенты, стероиды, иммуносупрессанты, а также ингибиторы Bcr-Ab1, Flt-3, RAF и FAK киназ, такие как описаны в WO 2006/056399, или другие агенты могут использоваться в сочетании с соединениями по настоящему изобретению для лечения JAK-связанных заболеваний, нарушений или состояний. Один или несколько дополнительных фармацевтических агентов можно вводить пациенту одновременно или последовательно.

Примеры химиотерапевтических агентов включают протеасомные ингибиторы (например, бортезомид, талидомид, ревлимид) и ДНК-повреждающие агенты, такие как мелфалан, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, этопозид, кармустин и т.п.

Примеры стероидов включают кортикостероиды, такие как дексаметазон или преднизон.

Примеры ингибиторов Bcr-Ab1 включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли общего вида и разновидностей, описанные в патенте США 5521184, WO 04/005281, EP 2005/009967, EP 2005/010408 и патенте США № 60/578491.

Примеры подходящих ингибиторов Flt-3 включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, такие как описано в WO 03/037347, WO 03/099771 и WO 04/046120.

Примеры подходящих ингибиторов RAF включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, такие как описано в WO 00/09495 и WO 05/028444.

Примеры подходящих ингибиторов FAK включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, такие как описано в WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 и WO 01/014402.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы JAK по изобретению можно использовать в сочетании с химиотерапией при лечении рака, такого как множественная миелома, и они могут улучшить ответную реакцию на лечение по сравнению с ответной реакцией на сам по себе химиотерапевтический агент без эксцеребрации его токсического действия. Примеры дополнительных фармацевтических агентов, используемых при лечении множественной миеломы, например, могут включать, без ограничения, мелфалан, мелфалан плюс преднизон [MP], доксорубицин, дексаметазон и Велкад (бортезомиб). Другие дополнительные агенты, используемые для лечения множественной миеломы, включают ингибиторы Bcr-Ab1, Flt-3, RAF и FAK киназы. Аддитивное, или синергетическое, действие является желательным результатом комбинирования ингибитора JAK по настоящему изобретению с дополнительным агентом. Кроме того, резистентность клеток множественной миеломы к агентам, таким как дексаметазон, может быть обратимой при лечении с использованием ингибитора JAK по настоящему изобретению. Данные агенты можно комбинировать вместе с настоящими соединениями в виде единой или постоянной препаративной формы, или агенты можно вводить одновременно или последовательно в виде отдельных препаративных лекарственных форм.

В некоторых вариантах осуществления кортикостероид, такой как дексаметазон, вводят пациенту в сочетании по крайней мере с одним ингибитором JAK, где дексаметазон вводят периодически в противоположность постоянному введению.

В некоторых следующих вариантах осуществления комбинации одного или нескольких ингибиторов JAK по изобретению с другими терапевтическими агентами можно вводить пациенту до, во время и/или после трансплантации костного мозга или стволовых клеток.

Фармацевтические препараты и дозированные лекарственные формы.

При использовании в качестве лекарственных средств соединения по изобретению можно применять в виде фармацевтических композиций. Данные композиции могут быть получены способом, хорошо известным в области фармацевтики, и их можно вводить с помощью множества путей введения в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от области, подвергаемой лечению. Введение может быть наружным (включая чрескожное, эпидермическое, офтальмологическое и через слизистую оболочку, включая внутриназальную, влагалищную и ректальную доставку лекарственного средства), легочным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, включая использование небулайзера; внутритрахеальное или внутриназальное), пероральное или парентеральное. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривентрикулярную, внутримышечную инъекцию или вливание; или внутрочерепное, например интратекальное или интравентрикулярное, введение. Парентеральное введение может быть в виде единственной болюсной дозы или может непрерывно подаваться перфузионным насосом. Фармацевтические композиции и препараты для наружного применения могут включать чрескожные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут оказаться необходимыми или желательными. Также можно использовать покрытые слоем презервативы, перчатки и т.п.

Данное изобретение также включает фармацевтические композиции, которые содержат в качестве активного ингредиента, одно или несколько соединений по изобретению в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (эксципиентами). При получении композиций по изобретению активный ингредиент обычно смешивают с эксципиентом, разбавляют с помощью эксципиента или заключают в такой носитель в виде, например, капсулы, саше, бумаги или другого контейнера. Когда эксципиент выступает в качестве разбавителя, он может быть твердым, полужидким или жидким веществом, которое служит в качестве транспортного средства, носителя или среды для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут быть в виде таблеток, пилюль, порошков, пастилок, саше, облаток, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (в твердом виде или в жидкой среде), мазей, содержащих, например, до 10% по весу активного соединения, мягких или твердых желатиновых капсул, суппозиториях, стерильных растворов для инъекций и стерильных упакованных порошков.

При получении препарата, активное соединение может быть измельчено для получения частиц подходящего размера перед объединением с другими ингредиентами. Если активное соединение является по существу нерастворимым, оно может быть измельчено до размера частиц менее 200 меш. Если активное соединение является по существу водорастворимым, размер частиц может быть отрегулирован путем измельчения для получения по существу равномерного распределения в препарате, например примерно до 40 меш.

Некоторые примеры подходящих эксципиентов включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакантовую камедь, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп и метилцеллюлозу. Препараты могут дополнительно включать

- лубриканты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло;
- смачивающие агенты;
- эмульгирующие и суспендирующие агенты;
- консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоаты;
- подсластители и ароматизаторы.

Композиции по изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать быстрое, продолжительное или замедленное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с помощью способов, известных в данной области.

Композиции могут быть получены в виде единичных дозированных лекарственных форм, где каждая доза будет содержать от примерно 5 мг до примерно 1000 мг (1 г), более обычно примерно от 100 мг до примерно 500 мг, активного ингредиента. Термин "единичная дозированная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного вещества, рассчитанного для оказания желаемого терапевтического действия, в сочетании с подходящим фармацевтическим эксципиентом.

Активное соединение может быть эффективным в широком диапазоне дозировки, и обычно его вводят в фармацевтически эффективном количестве. Следует понимать, что фактически вводимое коли-

чество соединения будет определяться лечащим врачом в соответствии со значимыми обстоятельствами, включая состояние, подвергаемое лечению, выбранный путь введения, реальное вводимое соединение, возраст, вес и ответную реакцию индивидуального пациента, тяжесть симптомов у пациента и т.п.

Для получения твердых композиций, таких как таблетки, главный активный ингредиент смешивают с фармацевтическим эксципиентом с получением твердой предрецептурной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению. Когда данные предрецептурные композиции упоминаются как гомогенные, активный ингредиент обычно равномерно диспергируют в композиции таким образом, чтобы композиция могла быть разделена на равно эффективные единичные дозированные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Данную предрецептурную композицию затем разделяют на единичные дозированные лекарственные формы вышеуказанного типа, содержащие от, например, примерно 0,1 мг до примерно 1000 мг активного ингредиента, по настоящему изобретению.

Таблетки или пилюли по настоящему изобретению могут быть покрыты оболочкой или составлены другим образом для получения дозированной лекарственной формы, дающей преимущество продолжительного действия. Например, таблетка или пилюля могут включать компонент внутренней дозы и компонент внешней дозы, где последний имеет вид конверта для первого. Два компонента могут быть разделены растворимым в кишечнике слоем, который служит для противодействия разрушению в желудке и дает возможность внутреннему компоненту проходить в двенадцатиперстную кишку или замедлять свое высвобождение. Для таких растворимых в кишечнике слоев можно использовать множество материалов, включая ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот, с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Жидкие формы, в которые соединения и композиции по настоящему изобретению могут быть введены для перорального введения или введения путем инъекции, включают водные растворы, подходящим образом ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также эликсиры и аналогичные фармацевтические носители.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят через рот или носовой дыхательный путь для местного или системного действия. Композиции в металлическом контейнере можно распылять с помощью инертных газов. Распыляемые растворы можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства или распыляющее устройство может быть присоединено к маске для лица или дыхательной машине с переменным положительным давлением. Растворы, суспензии или порошкообразные композиции можно вводить перорально или назально из устройств, которые доставляют препарат подходящим образом.

Количество вводимого пациенту соединения или композиции будет меняться в зависимости от того, что вводится, цели введения, такой как профилактика или терапия, состояния пациента, способа введения и т.п. В терапевтических применениях композиции можно вводить пациенту, уже страдающему от заболевания, в количестве, достаточном для излечения или по крайней мере частичной приостановки симптомов заболевания и его осложнений. Эффективные дозы будут зависеть от болезненного состояния, подвергаемого лечению, а также от точки зрения лечащего врача в зависимости от факторов, таких как тяжесть заболевания, возраст, вес и общее состояние пациента и т.п.

Композиции, вводимые пациенту, могут являться описанными выше композициями. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными методами стерилизации или они могут быть стерилизованы фильтрованием. Водные растворы могут быть упакованы для применения в том виде, в котором они находятся, или лиофилизированы, и лиофилизированные препараты объединяют со стерильным водным носителем перед применением. Ph препаратов соединений обычно будет составлять между 3 и 11, более предпочтительно от 5 до 9 и наиболее предпочтительно от 7 до 8. Следует понимать, что применение некоторых из вышеупомянутых эксципиентов, носителей или стабилизаторов будет приводить к образованию фармацевтических солей.

Терапевтическая дозировка соединений по настоящему изобретению может меняться в соответствии, например, с конкретным применением, для которого проводится лечение, способом введения соединения, здоровьем и общим состоянием пациента и точкой зрения лечащего врача. Доля или концентрация соединения по изобретению в фармацевтической композиции может изменяться в зависимости от ряда факторов, включая дозировку, химические характеристики (например, гидрофобность) и путь введения. Например, соединения по изобретению могут быть обеспечены в водном физиологическом буферном растворе, содержащем примерно от 0.1% вес./об. до примерно 10% вес./об. соединения для парентерального введения. Некоторые типичные интервалы дозировки составляют от примерно 1 мкг/кг до примерно 1 г/кг веса тела в сутки. В некоторых вариантах осуществления диапазон дозировки составляет от примерно 0,011 мг/кг до примерно 100 мг/кг веса тела в сутки. Дозировка вероятно будет зависеть от таких переменных как тип и степень прогрессирования заболевания или нарушения, общее состояние здоровья конкретного пациента и относительной биологической эффективности выбранного соединения,

рецептуры эксципиента и пути введения. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ в тест-системах *in vitro* или на животных моделях.

Композиции по изобретению могут дополнительно включать одни или несколько дополнительных фармацевтических агентов, таких как химиотерапевтический агент, стероид, противовоспалительное соединение или иммуносупрессор, примеры которых перечислены выше в данном описании.

Меченые соединения и методы анализа.

Другой аспект настоящего изобретения относится к меченым соединениям по изобретению (радиоактивно меченным, флуоресцентно меченным и т.д.), которые могли бы быть полезными не только в способах визуализации, но также и в анализах, как *in vitro*, так и *in vivo*, для локализации и количественной оценки JAK в образцах тканей, включая ткани человека, и для идентификации лигандов JAK путем ингибирования связывания меченого соединения. Соответственно настоящее изобретение включает анализы JAK, которые содержат такие меченые соединения.

Настоящее изобретение дополнительно включает изотопно-меченные соединения по изобретению. "Изотопно" или "радиоактивно" меченным соединением является соединение по изобретению, в котором один или несколько атомов заменено или замещено на атом, имеющий атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе (т.е. природно существующие). Подходящие радионуклиды, которые могут быть введены в соединения по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются указанным ^2H (пишется так же, как D для дейтерия), ^3H (пишется так же, как T для трития), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I и ^{131}I .

Характер радионуклида, который вводят в настоящие радиоактивно меченные соединения, будет зависеть от конкретного применения такого радиоактивно меченого соединения. Например, для введения метки в металлопротеазы *in vitro* и конкурентных анализов наиболее полезными будут соединения, в которые введены ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S . Для применений в области радиоактивной визуализации наиболее полезными будут ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br или ^{77}Br .

Следует понимать, что "радиоактивно меченное" или "меченое соединение" представляет собой соединение, в которое введен по крайней мере один радионуклид. В некоторых вариантах осуществления радионуклид выбирают из группы, состоящей из ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S и ^{82}Br .

Настоящее изобретение может дополнительно включать синтетические способы для введения радиоизотопов в соединения по изобретению. Синтетические способы для введения радиоизотопов в органические соединения хорошо известны в данной области, и обычному специалисту будут очевидны способы, применимые для соединений по изобретению.

Меченое соединение по изобретению можно использовать в скрининговых анализах для идентификации/оценки соединений. Например, может быть проведена оценка способности связывать JAK вновь синтезированных или идентифицированных соединений (т.е. тестируемых соединений), которые являются мечеными путем мониторинга изменения их концентрации при контактировании с JAK посредством отслеживания метки. Например, может быть проведена оценка способности тестируемого соединения (меченого) уменьшать связывание другого соединения, для которого известно, что оно связывается с JAK (т.е. стандартное соединение). Соответственно способность тестируемого соединения конкурировать со стандартным соединением за связывание с JAK непосредственно коррелирует с его аффинностью связывания. Наоборот, в некоторых других скрининговых анализах стандартное соединение является меченым, а тестируемое соединение не является меченым. Соответственно контролируют концентрацию меченого стандартного соединения для оценки конкуренции между стандартным соединением и тестируемым соединением и таким образом определяют относительную аффинность связывания тестируемого соединения.

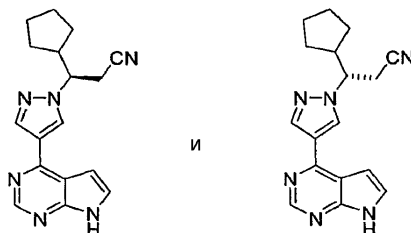
Наборы.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические наборы, которые могут использоваться, например, для лечения или профилактики JAK-связанных заболеваний или нарушений, таких как рак, которые включают один или несколько контейнеров, содержащих фармацевтическую композицию, включающую терапевтически эффективное количество соединения по изобретению. Такие наборы могут дополнительно включать при желании один или несколько различных обычных компонентов фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры, с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т.д., что будет очевидно для специалиста в данной области. Инструкции в виде вкладышей или этикеток, указывающие количества компонентов для введения, указания для введения и/или указания для смешивания компонентов, также могут быть включены в набор.

Изобретение будет более подробно описано с помощью конкретных примеров. Следующие примеры приведены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом. Специалистам в данной области будет легко понятно множество не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы с получением по существу таких же результатов. В соответствии с по крайней мере одним из описанных здесь анализов было установлено, что соединения по изобретению являются ингибиторами JAK.

Примеры

Пример 1. (3R)- и (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрил.



Стадия 1.

К (2E)- и (2Z)-3-циклопентилакрилонитрил 1,0 М раствору трет-бутоксид калия в ТГФ (235 мл) при 0°C добавляли по каплям раствор диэтилцианометилфосфоната (39,9 мл, 0,246 моль) в ТГФ (300 мл). Охлаждающую баню убрали и реакционную смесь нагревали до комнатной температуры с последующим охлаждением до 0°C, при этом в данный момент добавляли по каплям раствор циклопентанкарбальдегида (22,0 г, 0,224 моль) в ТГФ (60 мл). Баню убрали и реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 64 ч. Смесь распределяли между диэтиловым эфиром и водой, водный слой экстрагировали тремя порциями эфира, а затем двумя порциями этилацетата. Объединенные экстракты промывали насыщенным водным раствором соли, затем сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая смесь, содержащую 24,4 г изомерных олефинов, которую использовали без дополнительной очистки (89%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6,69 (дд, 1H, транс-олефин), 6,37 (т, 1H, цис-олефин), 5,29 (дд, 1H, транс-олефин), 5,20 (д, 1H, цис-олефин), 3,07-2,95 (м, 1H, цис-продукт), 2,64-2,52 (м, 1H, транс-продукт), 1,98-1,26 (м, 16H).

Стадия 2. (3R)- и (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7-[2-(триметилсилил)этокси]метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрил.

К раствору 4-(1Н-пиразол-4-ил)-7-[2-(триметилсилил)этокси]метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидина (15,0 г, 0,0476 моль) в АСН (300 мл) добавляли 3-циклопентилакрилонитрил (15 г, 0,12 моль) (в виде смеси цис- и транс-изомеров) с последующим добавлением ДБУ (15 мл, 0,10 моль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. АСН упаривали. Смесь разбавляли этилацетатом, и раствор промывали 1,0N HCl. Органический слой опять экстрагировали тремя порциями этилацетата. Объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором соли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (градиент этилацетата в гексанах), получая вязкий прозрачный сироп, который растворяли в этаноле и упаривали несколько раз для удаления этилацетата, получая 19,4 г рацемического аддукта (93%). Энантиомеры разделяли препаративной ВЭЖХ (OD-H, 15% этанол/гексаны) и использовали по отдельности на следующей стадии для образования соответствующего им конечного продукта. Было установлено, что конечные продукты (см. стадия 3), происходящие из каждого из разделенных энантиомеров, являются активными ингибиторами JAK, однако конечный продукт, полученный из второго пика на препаративной ВЭЖХ, был более активен, чем его энантиомер.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): δ 8,85 (с, 1H), 8,32 (с, 2H), 7,39 (д, 1H), 6,80 (д, 1H), 5,68 (с, 2H), 4,26 (дт, 1H), 3,54 (т, 2H), 3,14 (дд, 1H), 2,95 (дд, 1H), 2,67-2,50 (м, 1H), 2,03-1,88 (м, 1H), 1,80-1,15 (м, 7H), 0,92 (т, 2H), -0,06 (с, 9H).

Масс-спектр (ES): 437 (M+1).

Стадия 3.

К раствору 3-циклопентил-3-[4-(7-[2-(триметилсилил)этокси]метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]пропаннитрила (6,5 г, 0,015 моль, R или S энантиомер, выделенный, как указано выше) в ДХМ (40 мл) добавляли ТФУК (16 мл) и эту смесь перемешивали в течение 6 ч. Растворитель и ТФУК удаляли в вакууме. Остаток растворяли в ДХМ и концентрировали с использованием роторного испарителя еще два раза для удаления максимально возможного количества ТФУК. После этого остаток перемешивали с этилендиамином (4 мл, 0,06 моль) в метаноле (30 мл) в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме, добавляли воду и продукт экстрагировали тремя порциями этилацетата. Объединенные экстракты промывали насыщенным водным раствором соли, сушили над сульфатом натрия, декантировали и концентрировали, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной флэш-хроматографией (элюирование градиентом метанол/ДХМ). Полученную смесь дополнительно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ/масс-спектрометрии (колонок C18, элюирование градиентом смеси АСН/H₂O, содержащей 0,15% NH₄OH), получая продукт (2,68 г, 58%).

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMCO): δ 12,11 (ушир. с, 1H), 8,80 (с, 1H), 8,67 (с, 1H), 8,37 (с, 1H), 7,60 (д, 1H), 6,98 (д, 1H), 4,53 (дт, 1H), 3,27 (дд, 1H), 3,19 (дд, 1H), 2,48-2,36 (м, 1H), 1,86-1,76 (м, 1H), 1,68-1,13 (м, 7H).

Масс-спектр (ES): 307 (M+1).

Пример А. Анализ киназы JAK *in vitro*.

Данные соединения протестированы на ингибирующую активность в отношении мишеней JAK в соответствии со следующим анализом *in vitro*, описанным в Park et al., *Analytical Biochemistry*, 1999, 269, 94-104. Каталитические домены JAK1 (а.а. 837-1142), JAK2 (а.а. 828-1132) и JAK3 (а.а. 781-1124) человека с N-концевым тагом His экспрессировали с использованием бакуловируса в клетках насекомых и очищали. Каталитическую активность JAK1, JAK2 or JAK3 оценивали путем измерения степени фосфорилирования биотинилированного пептида. Фосфорилированный пептид обнаруживали с помощью метода гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). Значения IC₅₀ соединений для каждой киназы измеряли в реакционных смесях, которые содержали фермент, АТФ и 500 нМ пептида в 50 мМ буфере Tris (pH 7,8) со 100 мМ NaCl, 5 мМ DTT и 0,1 мг/мл (0,01%) BSA. Концентрация АТФ в реакциях составляла 90 мкл для JAK1, 30 мкМ для JAK2 и 3 мкМ для JAK3. Реакции проводили при комнатной температуре в течение 1 ч и затем останавливали с использованием 20 мкл 45 мМ EDTA, 300 нМ SA-APC, 6 нМ Eu-Py20 в буфере для анализа (Perkin Elmer, Boston, MA). Связывание с меченным европием антителом происходило в течение 40 мин, и сигнал HTRF измеряли на планшетном ридере Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). Соединения, имевшие значения IC₅₀ 10 мкМ или меньше для любой из вышеуказанных мишеней JAK, рассматривали как активные.

Пример В. Клеточные анализы.

Одно или несколько описанных соединений было протестировано на ингибирующую активность в отношении мишеней JAK в соответствии с по крайней мере одним из следующих клеточных анализов.

Раковые клеточные линии, зависимые от цитокинов и, соответственно, сигнальной трансдукции JAK/STAT, размещали в планшетах из расчета 6000 клеток на лунку (96-луночный формат планшета) в RPMI 1640, 10% FBS в присутствии 1 нг/мл подходящего цитокина. Соединения добавляли к клеткам в ДМСО/среде (конечная концентрация 0,2% ДМСО) и инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Оценивали влияние соединения на выживаемость клеток с использованием люминесцентного анализа выживаемости клеток CellTiter-Glo (Promega) с последующей количественной оценкой с помощью TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Параллельно измеряли потенциальный недействительный эффект соединений с использованием не управляемой JAK клеточной линии с таким же самым принципом вывода данных в анализе. Соединения, имевшие значения IC₅₀ 10 мкМ или меньше с селективностью для управляемой JAK пролиферации, рассматривали как активные. Все эксперименты проводили в двукратной повторяемости.

Вышеуказанные клеточные линии также могут быть использованы для исследования действия соединений на фосфорилирование киназ JAK или потенциальных субстратов в прямом (5'-3') направлении, таких как белки STAT, AKT, Shp2 или ERK. Данные эксперименты могут быть выполнены после выращивания клеток на минимальной среде без цитокинов с последующим кратким периодом предварительной инкубации с соединением (2 ч или меньше) и стимуляцией цитокином в течение приблизительно 1 ч или меньше. Белки затем экстрагируют из клеток и анализируют методами, знакомыми специалистам в данной области, включая вестерн-блоттинг или ELISA с использованием антител, которые различают фосфорилированные и общие белки. В данных экспериментах можно использовать обычные или раковые клетки для исследования активности соединений на биологию выживания опухолевых клеток или на медиаторы воспалительного заболевания. Например, в отношении последнего цитокина, такие как IL-6, IL-12, IL-23 или IFN, можно использовать для стимуляции активации JAK, приводящей к фосфорилированию белка(ов) STAT и потенциально к транскрипционным профилям (оцениваемым по ранжированному ряду или методом qПЦР) или продуцированию и/или секреции белков, таких как IL-17. Способность соединений ингибировать данные, опосредованные цитокинами действия, может быть измерена с использованием способов, обычных для специалистов в данной области.

Данные соединения также могут быть протестированы на клеточных моделях, разработанных для оценки их эффективности и активности против мутантных JAK, например мутации JAK2V617F, обнаруживаемой при миелоидных пролиферативных нарушениях. В данных экспериментах часто используют цитокин-зависимые клетки гематологического происхождения (например, BaF/3), в которые эктопически экспрессируют киназы JAK дикого типа или мутантные киназы JAK (James, C. et al., *Nature*, 434:1144-1148; Staerk, J. et al., *JBC*, 280:41893-41899). Конечная точка включает влияние соединений на выживание, пролиферацию клеток и фосфорилированные белки JAK, STAT, AKT или ERK.

Для некоторых соединений данного изобретения была или могла быть оценена их активность в отношении ингибирования пролиферации Т-клеток. Такой анализ можно рассматривать как второй цитокин, т.е. JAK-управляемый анализ пролиферации и также упрощенный анализ иммунной супрессии или ингибирования иммунной активации. Далее приведено краткое описание того, как такие эксперименты могут быть проведены. Моноядерные клетки периферической крови (PBMCs) получают из образцов цельной крови человека с использованием метода разделения Ficoll Нураке, и Т-клетки (фракция 2000) могут быть получены из PBMCs путем классификации при обогащении. Свежевыделенные Т-клетки человека можно сохранять в культуральной среде (RPMI 1640, дополненный 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при плотности 2×10⁶ клеток/мл при 37°C до

2 дней. Для стимулированного IL-2 анализа пролиферации клеток Т-клетки первоначально обрабатывали фитогемагглютинином (PHA) в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 72 ч. После однократной промывки PBS 6000 клеток/лунку размещали в 96-луночных планшетах и обрабатывали соединениями в различных концентрациях в культуральной среде в присутствии 100 ед/мл IL-2 человека (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 72 ч и оценивали индекс пролиферации с использованием люминесцентных реагентов CellTiter-Glo в соответствии с протоколом, предлагаемым производителем (Promega; Madison, WI).

Пример С. Противоопухолевая эффективность *in vivo*.

Описанные здесь соединения могут быть оценены на моделях ксенотрансплантата опухоли человека и мыши с нарушенным иммунитетом. Например, опухолевогенный вариант плазматомной клеточной линии INA-6 может быть использован для подкожной инокуляции мышей SCID (Burger, R. et al., Nematol J., 2:42-53, 2001). Имеющие опухоль животные затем могут быть случайным образом разделены на группы обработки лекарственным средством и обработки плацебо, и им можно вводить различные дозы соединений с помощью любого числа обычных путей, включая пероральное, внутрибрюшинное или непрерывное вливание с использованием имплантированных насосов. За ростом опухолей следят с использованием штангенциркуля. Далее образцы опухолей могут быть собраны в любой момент времени после начала лечения для анализа, как описано выше (пример В), для оценки действия соединений на активность JAK и сигнальных путей в прямом направлении. Кроме того, может быть оценена селективность соединений с использованием моделей ксенотрансплантата опухоли, которые управляются другими известными киназами (например, Bcr-Abl), такой как модель опухоли K562.

Пример D. Тест контактного замедленного гиперчувствительного ответа на коже мышей.

Описанные здесь соединения также могут быть протестированы на их эффективность (ингибирование мишеней JAK) на управляемой Т-клетками мышшиной модели замедленной гиперчувствительности. Контактный гиперчувствительный ответ замедленного типа на коже мышей (DTH) рассматривается как ценная модель клинического контактного дерматита и других опосредованных Т-лимфоцитами иммунных нарушений на коже, таких как псориаз (Immunol. Today., 1998 Jan, 19(1):37-44). Мышиный DTH имеет множество общих характеристик с псориазом, включая иммунный инфильтрат, сопутствующее увеличение концентрации воспалительных цитокинов и гиперпролиферацию кератиноцитов. Кроме того, многие классы агентов, которые являются эффективными для лечения псориаза в клинике, также являются эффективными ингибиторами DTH ответной реакции у мышей (Agents Actions., 1993 Jan, 38(1-2):116-21).

В день 0 и 1 мышей Balb/c сенсибилизировали с помощью местного нанесения на их выбритую брюшную полость антигена 2,4-динитро-фторбензола (DNFB). На 5 день измеряли толщину ушей с использованием инженерного микрометра. Измерения регистрировали и использовали в качестве базовой линии. Оба уха животных затем обрабатывали DNFB путем местного нанесения всего 20 мкл (10 мкл на внутреннюю ушную раковину и 10 мкл на внешнюю ушную раковину) при концентрации 0,2%. В промежутки от 24 до 72 ч после обработки опять проводили измерение ушей. Обработку тестируемыми соединениями проводили на протяжении фаз сенсибилизации и обработки веществом, вызывающим выработку антител (день 1-7), или перед и во время фазы обработки веществом, вызывающим выработку антител (обычно после дня с 4 до 7). Обработку с использованием тестируемых соединений (в различных концентрациях) проводили или системно, или наружно (наружное нанесение лекарственным средством на уши). Эффективность тестируемых соединений показывали путем уменьшения отека уха по сравнению с ситуацией в отсутствие обработки лекарственным средством. Соединения, вызывавшие уменьшение на 20% или более, рассматривались как эффективные. В некоторых экспериментах проводили обработку мышей веществом, вызывающим выработку антител, но не проводили сенсибилизацию (отрицательный контроль).

Ингибирующее действие (ингибирующая активация путей JAK-STAT) для тестируемых соединений может быть подтверждено путем иммуногистохимических анализов. Активация пути(ей) JAK-STAT приводит к образованию и перемещению функциональных факторов транскрипции. Кроме того, приток иммунных клеток и повышенная пролиферация кератиноцитов также должны обеспечивать уникальный профиль экспрессии в ухе, который может быть исследован и количественно оценен. Фиксированные в формалине и вставленные в парафин срезы уха (полученные после фазы обработки веществом, вызывающим выработку антител на модели DTH) подвергали иммуногистохимическому анализу с использованием антитела, которое специфически взаимодействует с фосфорилированным STAT3 (клон 58E12, Cell Signaling Technologies). Уши мышей для сравнения обрабатывали тестируемыми соединениями, носителем или дексаметазоном (клинически эффективное лечение псориаза) или оставляли без какой-либо обработки в модели DTH. Тестируемые соединения и дексаметазон могут вызвать аналогичные транскрипционные изменения как качественно, так и количественно, и как тестируемые соединения, так и дексаметазон могут снижать количество инфильтрованных клеток. Как системное, так и местное введение испытываемых соединений может обеспечить ингибирующее действие, т.е. уменьшение числа инфильтрованных клеток и ингибирование транскрипционных изменений.

Пример E. Противовоспалительная активность *in vivo*.

Для описанных здесь соединений может быть или была проведена оценка на моделях грызунов и не

грызунов, разработанных для репликации единственного или комплексного воспалительного ответа. Например, модель грызунов для артрита может быть использована для оценки терапевтического потенциала соединений, дозированных в профилактических или терапевтических целях. Данные модели включают, но не ограничиваются указанным, мышинный или крысиный индуцированный коллагеном артрит, крысиный адьювант-индуцированный артрит и индуцированный антителом к коллагену артрит. Аутоиммунные заболевания, включая, но не ограничиваясь указанным, рассеянный склероз, сахарный диабет типа I, увеоретинит, тиреоидит, бульбоспинальный паралич, иммуноглобулиновые нефропатии, миокардит, аллергические реакции дыхательных путей (астма), волчанку или колит, могут быть использованы для оценки терапевтического потенциала описанных здесь соединений. Данные модели были разработаны научно-исследовательским сообществом и знакомы специалистам в данной области (Current Protocols in Immunology, vol. 3., Coligan, J.E. et al., Wiley Press.; Methods in Molecular Biology, vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G.; и Willoughby, D.A., Humana Press, 2003).

Различные модификации изобретения в дополнение к описанным здесь будут очевидны специалистам в данной области из вышеприведенного описания. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения. Каждая ссылка, процитированная в настоящей заявке, включена в нее путем ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственное средство для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK, включающее терапевтически эффективное количество 3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Лекарственное средство по п.1, где соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Лекарственное средство по п.1, где соединение представляет собой (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Применение соединения 3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрила или его фармацевтически приемлемой соли для лечения атопического дерматита у пациента, при этом указанное заболевание связано с активностью JAK.

5. Применение по п.4, где соединение представляет собой (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

6. Применение по п.4, где соединение представляет собой (3S)-3-циклопентил-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]пропаннитрил или его фармацевтически приемлемую соль.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2