

EI56270R/EX6881R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3555097

a nome di:

Janssen Pharmaceutica NV

"Composti imidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridinici come inibitori di chinasi Janus"

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda alcuni composti imidazopirrolpiridinici e composizioni farmaceutiche che li contengono.

FONDAMENTO

Fattori interni, fattori esterni o una combinazione di entrambi i fattori possono innescare o essere associati con lo sviluppo di risposte immunitarie anomale nell'organismo. Di conseguenza, si sviluppano stati patologici in cui costituenti, quali sostanze e tessuti, che sono normalmente presenti nel corpo, sono soggetti a tale risposta immunitaria. Questi stati sono genericamente indicati come malattie del sistema immunitario. Poiché il sistema immunitario del corpo è coinvolto ed il danno colpisce il tessuto corporeo, tali malattie vengono anche indicate come malattie autoimmuni. Poiché tale sistema e tessuto fanno parte dello stesso corpo, i termini "malattia autoimmune" e "malattia del sistema immunitario" sono usati qui in modo intercambiabile, indipendentemente da ciò che innesca la risposta anomala del sistema immunitario. Inoltre, l'identità o il meccanismo del problema immunitario sottostante non sempre sono chiari. Si veda ad esempio, D.J. Marks, et al., Crohn's disease: An immunodeficiency state, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 38(1), 20-30 (2010); J.D. Lalande, et al, Mycobacteria in Crohn's disease: How innate immune deficiency may result in chronic inflammation, *Expert Reviews of Clinical Immunology* 6(4), 633-41 (2010); J.K. Yamamoto-Furusho, et al., Crohn's disease: Innate immunodeficiency, *World Journal of Gastroenterology*, 12(42), 6751-55 (2006). Come qui usato, il termine "malattia autoimmune" non esclude condizioni le cui cause comprendono fattori o agenti esterni, come fattori ambientali o batterici, e fattori interni come suscettibilità genetica. Di conseguenza, una condizione come il morbo di Crohn (CD) viene qui indicata come una malattia autoimmune, indipendentemente dal fatto che essa sia innescata dal corpo stesso o da fattori esterni. Si veda ad esempio: J. L. Casanova, et al., Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages, *J. Exp. Med.* 206(9), 1839-43 (2009).

Tra i vari effetti avversi causati da malattie autoimmuni, è tipicamente osservato almeno uno dei seguenti: danno a, e a volte distruzione di, tessuti, e alterazione di organi che possono influenzare la crescita di organi e la

funzione di organi. Esempi di malattie autoimmuni colpiscono la maggior parte degli organi principali, delle ghiandole endocrine ed esocrine, del sangue e dei muscoli e una pluralità di sistemi, come i sistemi digestivo, vascolare, connettivo e nervoso. I trattamenti immunosoppressivi vengono spesso adottati per trattare malattie autoimmuni.

Sono note molteplici teorie per spiegare come sorgono le malattie autoimmuni, alcune che si concentrano su fattori endogeni e altre che includono anche fattori esogeni. A livello molecolare, la via di segnalazione di Janus chinasi/trasduttore di segnali ed attivatore della trascrizione (JAK/STAT) è considerata tale da svolgere un ruolo importante nella trasmissione delle informazioni dai segnali chimici extracellulari al nucleo cellulare, portando alla regolazione dei geni che sono coinvolti in attività cellulari come l'immunità. Le citochine sono un esempio di una molecola extracellulare che svolge un ruolo importante nella segnalazione cellulare. I leucociti come i neutrofili vengono reclutati da citochine e chemiochine per causare in ultima analisi un danno tissutale in malattie infiammatorie croniche.

La famiglia delle proteine Janus chinasi (JAK) è costituita da 4 tirosina chinasi, JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2, che sono fondamentali per la segnalazione intracellulare dei recettori delle citochine di tipo I e di tipo II. Il termine JAK si riferisce a JAK1, JAK2, JAK3 o Tyk2 o a qualsiasi loro combinazione. Ogni JAK associa selettivamente le subunità recettoriali che dimerizzano (o multimerizzano) per formare recettori funzionali. Secondo J.D. Clark, et al., *Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases*, *J. Med. Chem.* 57(12), 5023-38 (2014), "la fase di attivazione si verifica quando una citochina si lega al suo recettore, inducendo una multimerizzazione (dimerizzazione o complessi di ordine superiore) delle subunità recettoriali. Questo porta le JAK associate a ciascuna subunità prossimali tra loro, innescando una serie di eventi di fosforilazione che portano alla fosforilazione e all'attivazione di trasduttori di segnale e di attivatori delle proteine di trascrizione (STAT). Un dimero STAT fosforilato quindi trasloca al nucleo della cellula dove si lega a geni bersaglio modulandone l'espressione." Una volta nel nucleo, gli STAT regolano la trascrizione genica di numerosi mediatori nel processo infiammatorio tramite legame a siti di riconoscimento specifici sul DNA. Si veda ad esempio, *J. Med. Chem.* 57(12), 5023-38 (2014), citato sopra. Esistono notevoli evidenze che

dimostrano l'importanza della via di JAK/STAT nelle malattie infiammatorie, autoimmuni e nel cancro. Si veda ad esempio: M. Coskun, et al., Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013); e J.J. O'Shea, et al., JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer, *The New England Journal of Medicine* 368, 161-70 (2013).

Malattie infiammatorie intestinali, tra cui il morbo di Crohn e la colite ulcerosa (UC), sono caratterizzate da infiammazione intestinale ricorrente, distruzione della barriera epiteliale e disbiosi microbica. La risposta infiammatoria eccessiva nel tratto gastrointestinale è mediata da diverse citochine pro-infiammatorie che includono TNF α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-21 e IL-23 che esercitano i loro effetti sulle cellule del sistema immunitario innato e adattativo comprendente linfociti T e B, cellule epiteliali, macrofagi e cellule dendritiche (DC). Si veda ad esempio: *Pharmacological Research* 76, 1-8 (2013), citato sopra; S. Danese, et al., JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: A hub for multiple inflammatory cytokines, *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* 310, G155-62 (2016); e M.F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Immunology* 14, 329-42 (2014).

La prevenzione e/o il controllo di tale eccessiva risposta infiammatoria sono auspicabili. Alla luce del meccanismo di tale risposta come riassunto sopra, è prevista inibizione di JAK (vedere illustrazione nella figura 1 sotto forma di una freccia dentellata che mostra un inibitore pan-JAK che colpisce la via di segnalazione JAK/STAT e l'infiammazione) per prevenire o regolare una risposta infiammatoria eccessiva. Inibitori di JAK che inibiscono una pluralità di tali proteine JAK, sono qui indicati come inibitori pan-JAK. Esempi di benefici terapeutici di tale prevenzione o controllo sono stati osservati con tofacitinib, un inibitore pan-JAK biodisponibile per via orale approvato negli Stati Uniti per il trattamento dell'artrite reumatoide e attualmente in fase di sviluppo clinico per la colite ulcerosa. In uno studio clinico di Fase 2, sono stati valutati 194 pazienti con colite ulcerosa da moderata a severa per l'efficacia clinica. Vedere, *ad esempio*, W.J. Sandborn, et al., Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis, *The New England Journal of Medicine* 367, 616-24 (2012). Le informazioni pubblicate su questo studio indicano che i pazienti che ricevono dosi due

volte al giorno (BID) di 0,5, 3, 10 e 15 mg hanno raggiunto percentuali di risposta clinica di 32, 48, 61 e 78% rispettivamente, rispetto al 42% osservato in placebo. È stato inoltre riportato che il punto finale secondario della remissione clinica (punteggio Mayo ≤ 2) era di 13, 33, 48 e 41% rispetto al 10% osservato in placebo. Vedere, *ad esempio*, The New England Journal of Medicine 367, 616-24 (2012), citato sopra. In una sperimentazione clinica in Fase 3 UC, 88 su 476 pazienti hanno riportato di aver ottenuto remissione clinica dopo 8 settimane di trattamento con tofacitinib (10 mg BID) rispetto a 10 su 122 pazienti che ricevono un trattamento con placebo. Vedere W.J. Sandborn, et al. Efficacy and safety of oral tofacitinib as induction therapy in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis: results from 2 phase 3 randomised controlled trials, J. Crohns Colitis 10, S15-S (2016). Rapporti sul morbo di Crohn indicano che il tofacitinib era in sviluppo anche per il trattamento del CD; tuttavia, secondo quanto riportato, esso è stato interrotto a causa del mancato raggiungimento dell'efficacia clinica in una sperimentazione clinica da 4 settimane/Fase 2 per CD da moderata a severa. Vedere W.J. Sandborn, et al., A phase 2 study of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in patients with Crohn's disease, Clinical gastroenterology and hepatology: The official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 12, 1485-93 e2 (2014). Sulla base della letteratura consultata pubblicamente disponibile, non è attualmente chiaro se l'insuccesso del tofacitinib in CD riguarda la progettazione di studi clinici, le differenze meccanicistiche tra UC e CD o eventi avversi sistemici che limitano la dose. Vedere Pharmacological Research 76, 1-8 (2013), citato sopra; Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 12, 1485-93 e2 (2014), citato sopra; e C.J. Menet, et al., Triazolopyridines as selective JAK1 inhibitors: from hit identification to GLPG0634, J. Med. Chem. 57, 9323-42 (2014). Alla luce delle caratteristiche di questo inibitore di JAK, è desiderabile trovare inibitori di JAK aggiuntivi per la prevenzione e/o il controllo della risposta infiammatoria eccessiva.

Sono stati riportati eventi avversi sistemici relativi a studi clinici di malattia infiammatoria intestinale (IBD) in Fase 2 e Fase 3 con tofacitinib. Vedere The New England Journal of Medicine 367, 616-24 (2012), citato sopra; Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association 12, 1485-93 e2 (2014), citato sopra; e J. Panes, et al. Efficacy and safety of oral

tofacitinib for induction therapy in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: results of a Phase 2b randomised placebo-controlled trial, *J. Crohns Colitis* 10, S18-S19 (2016). Questi eventi avversi includono conta di neutrofili assoluti diminuita (ANC), colesterolo totale elevato (lipide a bassa ed alta densità), perforazione intestinale, ed infezione. Tali eventi avversi sono coerenti con quelli osservati a seguito di trattamento con facitinib in pazienti di artrite reumatoide (RA) (si veda, per esempio, J.M. Kremer, et al. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo, *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009)), alcuni dei quali probabilmente derivano dall'inibizione dipendente da JAK2 di EPO, TPO e dai fattori di stimolazione di colonie (csf-2 e GM-CSF (fattore di stimolazione di colonie di macrofagi-granulociti) e/o dall'inibizione dipendente da JAK1 di IL-6. Vedere *Arthritis and Rheumatism* 60, 1895-905 (2009), citato sopra; e O.H. Nielsen, et al., Will novel oral formulations change the management of inflammatory bowel disease? *Expert Opinion on Investigational Drugs* 25, 709-18 (2016).

Con riferimento alla figura 1, una medicazione somministrata per via orale può in linea di principio seguire il tratto gastro-intestinale dalla bocca all'esofago (1), allo stomaco (2) attraverso il duodeno (3) al digiuno (4), quindi all'ileo (5) e poi al colon (6). Le aree di assorbimento relative per tali varie parti sono circa 60% per il digiuno (4), circa 26% per l'ileo (5) e circa 13% per il colon (6). L'assorbimento attraverso queste varie regioni gastro-intestinali può portare all'insorgere di distribuzione sistemica che a sua volta potrebbe condurre ad effetti collaterali indesiderabili. Il tratto gastroenterico ha una superficie molto ampia. Si veda ad esempio: H.F. Helander, et al., Surface area of the digestive tract - revisited, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49(6), 681-89 (2014); e K.J. Filipski, et al., Intestinal Targeting of Drugs: Rational Design Approaches and Challenges *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13, 776-802 (2013). Una area superficiale di assorbimento così estesa favorisce la distribuzione sistemica di sostanze che possono attraversare le pareti delle varie parti del tratto intestinale e nel flusso sanguigno, e a loro volta hanno il potenziale di determinare effetti collaterali indesiderati di una sostanza distribuita per via sistemica. La distribuzione sistemica è rappresentata da frecce tratteggiate in figura 1 come permeante, per scopi illustrativi, attraverso le pareti del colon, ma tale distribuzione non è limitata

alle pareti del colon, potendo avvenire anche attraverso le pareti di altre parti del tratto gastrointestinale mostrato in figura 1, quali quelle dell'intestino tenue. È anche compreso che le linee a freccia a tratti in Fig. 1 rappresentano una distribuzione sistemica oltre il tratto gastrointestinale in quanto tale distribuzione sistemica è nota per avvenire in riferimento alla fisiologia del tratto gastrointestinale, e che tali frecce tratteggiate semplicemente si riferiscono in modo schematico illustrativo a tale distribuzione sistemica. Si veda ad esempio *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13, 777-80 (2013), citato sopra, per una descrizione del tessuto intestinale, del trasporto attraverso di esso, e metabolismo.

Un motivo principale per l'attrito nei candidati farmaci è la sicurezza e la tollerabilità. Si veda ad esempio I. Kola, et al., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 711-5 (2004); M.J. Waring, et al., An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery* 14,475-86 (2015); M. Hay, et al., Clinical development success rates for investigational drugs, *Nature Biotechnology* 32, 40-51 (2014); e M.E. Bunnage, Getting pharmaceutical R&D back on target, *Nature Chemical Biology* 7, 335-9 (2011). Aumentando le concentrazioni tissutali locali di composto verso il tessuto bersaglio desiderato, limitando al contempo l'esposizione ad altri tessuti, si possono ridurre effetti collaterali indesiderati. Si veda ad esempio, V.P. Torchilin, Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 11 Suppl 2, S81-91 (2000). Questo concetto è stato ampiamente accettato per talune malattie e tessuti, come l'occhio (si veda ad esempio, R. Gaudana, et al., Ocular drug delivery, *The AAPS Journal* 12, 348-60 (2010) la pelle (si veda ad esempio, R. Folster-Holst, et al., Topical hydrocortisone 17-butyrate 21-propionate in the treatment of inflammatory skin diseases: pharmacological data, clinical efficacy, safety and calculation of the therapeutic index, *Die Pharmazie* 71, 115-21 (2016)), e il polmone (si veda, per esempio, J.S. Patil, et al., Pulmonary drug delivery strategies: A concise, systematic review, *Lung India: official organ of Indian Chest Society* 29, 44-9 (2012)). Analogamente a questi approcci di indirizzamento tissutale, l'aumento delle concentrazioni di farmaco intestinale limitando al contempo i livelli di farmaco indesiderati in altri tessuti può aumentare i margini di sicurezza. Si veda ad esempio, I.R. Wilding, et al., Targeting of drugs and vaccines to the gut, *Pharmacology &*

Therapeutics 62, 97-124 (1994); D. Charlot, Non-systemic drugs: a critical review, Current Pharmaceutical Design 18, 1434-45 (2012); and Current Topics in Medicinal Chemistry 13, at 780 (2013), citato sopra. La modulazione selettiva per tessuto di bersagli nel tessuto gastrointestinale con composti che raggiungono esposizioni sistemiche limitate può potenzialmente migliorare l'indice terapeutico di tali composti per il trattamento di malattie del tratto gastrointestinale comprendenti colite ulcerosa e morbo di Crohn. Si veda ad esempio, O. Wolk, et al., New targeting strategies in drug therapy of inflammatory bowel disease: mechanistic approaches and opportunities, Expert Opin. Drug Deliv. 10(9), 1275-86 (2013). Il termine "effetti sistemici" è qui usato per riferirsi all'esposizione sistemica e agli effetti di qualsiasi tale esposizione sistemica, sebbene non siano sempre gli stessi.

Dato che alcuni inibitori di JAK noti hanno effetti avversi che sono associati ai loro effetti sistemici, è desiderabile trovare nuovi inibitori di JAK come sostanze attive per la prevenzione e/o la regolazione di una risposta infiammatoria eccessiva e i cui effetti sistemici sono eliminati o ridotti. È inoltre desiderabile trovare inibitori di JAK con effetti locali sui tessuti gastro-intestinali per il trattamento di condizioni quali, ma non limitate a, IBD, con ridotti effetti sistemici. A causa del ruolo svolto dalle varie proteine JAK, è inoltre desiderabile trovare inibitori pan-JAK.

L'indirizzamento dei tessuti intestinali può in linea di principio essere perseguito secondo molteplici strategie. Si veda ad esempio, Current Topics in Medicinal Chemistry 13, a 780-95 (2013), sopra citato, facendo riferimento ad approcci che includono approcci di proprietà chimico-fisiche, approcci mediati da trasporto, approcci di profarmaci e approcci di formulazione e tecnologia. Si riconosce, tuttavia, che esiste un "numero di sfide e di insidie che sono endemiche ai programmi di indirizzamento dei tessuti" e in particolare ai composti mirati all'intestino, come descritto in Current Topics in Medicinal Chemistry 13, al 795 (2013), citato sopra.

Le condizioni di IBD possono estendersi a più parti del tratto gastrointestinale. Sebbene a scopo illustrativo semplificato sia mostrato solo un sito di malattia del colon (10) nel colon discendente in Fig. 1, la malattia infiammatoria intestinale può colpire qualsiasi parte del tratto gastrointestinale come è il caso del morbo di Crohn, o nel retto e nel colon, come nella colite ulcerosa. Si veda, ad esempio, NIDDK (National Institute of

Diabetes, and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, <<http://spotidoc.com/doc/71780/crohns-disease---national-digestive-diseases-information>>, accesso 29 Novembre 2016. I siti della malattia di IBD possono essere, per esempio, ileale (situato nell'ileo), ileo-colico (che colpisce porzioni dell'ileo e del colon) e del colon (situato nel colon, come mostrato a titolo illustrativo nel colon discendente in Figura 1). Quindi, in alcuni scenari di malattia, può essere desiderabile un rilascio di farmaco lungo l'intera porzione o una grande porzione del tratto intestinale. In altri scenari di malattia, può essere desiderabile aumentare la concentrazione locale a qualsiasi porzione data del tratto gastrointestinale. Ancora in altri scenari, potrebbe essere desiderabile una combinazione di queste due forme di rilascio in corrispondenza di siti differenti nel tratto intestinale.

Uno di tali scenari si concentrerà sul rilascio di una sostanza attiva che ha effetti sistemici limitati a causa di assorbimento limitato quando passa attraverso il tratto gastrointestinale come illustrato dalle frecce a tratto pieno in Fig. 1, mentre è disponibile ad agire in porzioni estese del tratto gastrointestinale (GI), una caratteristica che è qui chiamata "effetti GI locali". A causa di ridotti effetti sistemici, si potrebbe valutare per tale sostanza una gamma più ampia di dosaggi. Sarebbe inoltre desiderabile se tale sostanza attiva avesse bassa permeabilità, cosicché solo una piccola quantità passa attraverso la parete intestinale nel flusso sanguigno per limitare effetti collaterali negativi indesiderabili quando raggiunge aree non bersaglio.

In aggiunta, gli inibitori di JAK sono previsti come candidati di trattamento per altre malattie. Essi sono previsti per l'uso nel trattamento di condizioni oculari tra cui l'occhio secco (B. Colligris, et al., Recent developments on dry eye disease treatment compounds, *Saudi J. Ophthalmol.* 28(1), 19-30 (2014)), neoplasie mieloproliferative, malattie mieloproliferative (E.J. Baxter, et al., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, *Lancet* 365, 1054-1061 (2005); C. James, et al., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera, *Nature* 434, 1144-1148 (2005); R. Kralovics, et al., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders, *N. Engl. J. Med.* 352, 1779-1790 (2005); R.L. Levine, et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis, *Cancer Cell* 7, 387-397 (2005); G. Wernig, et al.,

Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera, *Cancer Cell* 13, 311-320 (2008)), sindrome mieloproliferativa, leucemia mieloide acuta, sindrome da risposta infiammatoria sistemica, artrite reumatoide giovanile ad insorgenza sistemica, artrite idiopatica sistemica (H.W. Li, et al., Effect of miR-19a and miR-21 on the JAK/STAT signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis, *Exp. Ther. Med.* 11(6), 2531-2536 (2016)), reazioni da ipersensibilità di tipo III, ipersensibilità di tipo IV, infiammazione dell'aorta, iridociclite/uveite/neurite ottica, atrofia muscolare spinale giovanile, retinopatia diabetica, malattia renale diabetica compresa nefropatia diabetica (F.C. Brosius, et al., JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease, *Diabetologia* 59(8), 1624-7, (2016); C.C. Berthier, et al., Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy, *Diabetes* 58(2), 469-77, (2009); E.N. Gurzov, et al., The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes, *FEBS J.* 283(16), 3002-15 (2016)), microangiopatia, infiammazione (M. Kopf, et al., Averting inflammation by targeting the cytokine environment, *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 703-718 (2010); J.J. O'Shea, et al., A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway, *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 555-564 (2004)), infiammazione cronica, malattia intestinale infiammatoria inclusa colite ulcerosa (UC) e malattia di Crohn (R.H. Duerr, et al., A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene, *Science* 314, 1461-1463 (2006); M. Coskun, et al., Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Pharmacol. Res.* 76, 1-8 (2013); M.J. Waldner, et al., Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development, *Semin. Immunol.* 26(1), 75-9 (2014); S. Danese, et al., JAK inhibition using tofacitinib for inflammatory bowel disease treatment: a hub for multiple inflammatory cytokines, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310(3), G155-62 (2016); W. Strober, et al., Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology* 140, 1756-1767 (2011)), malattie allergiche, vitiligine, dermatite atopica (R. Bissonnette, et al., Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial, *Br. J. Dermatol.* 175(5), 902-911 (2016); W. Amano, et al., JAK inhibitor JTE-052 regulates contact hypersensitivity by downmodulating T cell activation and differentiation, *J.*

Dermatol. Sci. 84, 258-265 (2016); T. Fukuyama, et al., Topically Administered Janus-Kinase Inhibitors Tofacitinib and Oclacitinib Display Impressive Antipruritic and Anti-Inflammatory Responses in a Model of Allergic Dermatitis, J. Pharmacol. Exp. Ther. 354(3), 394-405 (2015)), alopecia areata (A.K. Alves de Medeiros, et al., JAK3 as an Emerging Target for Topical Treatment of Inflammatory Skin Diseases, PLoS One 11(10) (2016); L. Xing, et al., Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition, Nat. Med. 20(9), 1043-9 (2014)), dermatite sclerodermia, malattia immunitaria acuta o cronica associata con trapianto di organi (P.S. Changelian, et al. Prevention of organ allograft rejection by a specific Janus kinase 3 inhibitor, Science 302, 875-878 (2003); F. Behbod, et al. Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts, J. Immunol, 166, 3724-3732 (2001); S. Busque, et al., Calcineurin-inhibitor-free immunosuppression based on the JAK inhibitor CP-690,550: a pilot study in de novo kidney allograft recipients, Am. J. Transplant, 9, 1936-1945 (2009)), artropatia psoriasica, artropatia colitica ulcerativa, malattia bollosa autoimmune, anemia emolitica autoimmune, artrite reumatoide (J.M. Kremer, et al., A randomized, double-blind placebo-controlled trial of 3 dose levels of CP-690,550 versus placebo in the treatment of active rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum. 54 (abstract del convegno annuale), L40 (2006); W. Williams, et al., A randomized placebo-controlled study of INCB018424, a selective Janus kinase1&2 (JAK1&2) inhibitor in rheumatoid arthritis (RA), Arthritis Rheum. 58, S431 (2008); N. Nishimoto, et al., Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab, Ann. Rheum. Dis. 66(9), 1162-7 (2007)), malattia polmonare interstiziale associata ad artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico (A. Goropevsek, et al., The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus, Clin. Rev. Allergy Immunol. (pre-pubblicazione *on-line*) <<http://www.docguide.com/role-stat-signaling-pathways-pathogenesis-systemic-lupus-erythematosus?tsid=5>> 23 maggio 2016; M. Kawasaki, et al., Possible role of the JAK/STAT pathways in the regulation of T cell-interferon related genes in systemic lupus erythematosus, Lupus. 20(12), 1231-9 (2011); Y. Furumoto, et al., Tofacitinib ameliorates murine lupus and its associated vascular dysfunction, Arthritis

Rheumatol., (pre-pubblicazione on-line) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429362>> 18 luglio 2016)), malattia polmonare associata a lupus eritematoso sistemico, malattia polmonare associata a dermatomiosite/poliosite, asma (K. Vale, Targeting the JAK/STAT pathway in the treatment of 'Th2-high' severe asthma, *Future Med. Chem.* 8(4), 405-19 (2016)), spondilite anchilosante (AS) (C. Thompson, et al., Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis, *Cytokine* 86, 92-9 (2016)), malattia polmonare associata a AS, epatite autoimmune, epatite autoimmune di tipo 1 (epatite autoimmune classica o lupoide), epatite autoimmune di tipo 2 (epatite con anticorpi anti-LKM), ipoglicemia mediata a livello autoimmune, psoriasi (C.L. Leonardi, et al., Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1), *Lancet* 371, 1665-1674 (2008); G. Chan, et al., Dose-dependent reduction in psoriasis severity as evidence of immunosuppressive activity of an oral Jak3 inhibitor in humans, *Am. J. Transplant.* 6, S87 (2006); K.A. Papp, et al., Efficacy and safety of tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in the treatment of psoriasis: a phase 2b randomized placebo-controlled dose-ranging study, *Br. J. Dermatol.* 167, 668-677 (2012); M. Cargill, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes, *Am. J. Hum. Genet.* 80, 273-290 (2007)), psoriasi di tipo 1, psoriasi di tipo 2, psoriasi a placche, psoriasi a placche da moderata a grave, neutropenia autoimmune, autoimmunità spermatica, sclerosi multipla (tutti i sottotipi, B.M. Segal, et al., Repeated subcutaneous injections of IL,12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study, *Lancet Neurol.* 7, 796-804 (2008); Z. Yan, et al., Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases, *Clin. Immunol.* (pre-pubblicazione online) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713030>>, accesso 3 ottobre 2016; E.N. Benveniste, et al., Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Interferon Cytokine Res.* 34(8), 577-88 (2014); Y. Liu, et al., Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 192(1), 59-72 (2014)), febbre

reumatica acuta, sindrome di Sjogren, malattia polmonare associata a sindrome/malattia di Sjogren (T. Fujimura, et al., Significance of Interleukin-6/STAT Pathway for the Gene Expression of REG I α , a New Autoantigen in Sjögren's Syndrome Patients, in Salivary Duct Epithelial Cells, Clin. Rev. Allergy Immunol. (pre-pubblicazione on-line) <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339601>> 24 giugno 2016), trombocitopenia autoimmune, neuroinfiammazione inclusa malattia di Parkinson (Z. Yan, *et al.*, 3 ott., 2016, citato sopra). È stato riportato che gli inibitori di JAK hanno applicazioni terapeutiche nel trattamento del cancro oltre alle malattie infiammatorie. (S.J. Thomas, et al., The role of JAK/STAT signaling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumors, British J. Cancer 113, 365-71 (2015); A. Kontzias, et al., Jakinibs: A new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease, Current Opinion in Pharmacology, 12(4), 464-70 (Aug. 2012); M. Pesu, et al., Therapeutic targeting of JANUS kinases, Immunological Reviews, 223, 132-42 (Jun. 2008); P. Norman, Selective JAK inhibitors in development for rheumatoid arthritis, Expert Opinion on Investigational Drugs, 23(8), 1067-77 (Ago. 2014)). In aggiunta, gli inibitori di JAK potrebbero essere utili nella prevenzione del cancro del colon-retto poiché la riduzione dell'infiammazione nel colon potrebbe portare alla prevenzione del cancro in tale organo.

WO 2011/086053 A1 descrive composti che "possono essere forniti in composizioni accettabili farmaceuticamente e usati per il trattamento di disturbi immunologici o iperproliferativi".

WO 2013/007765 A1 descrive composti che "possono essere forniti in composizioni accettabili farmaceuticamente e usati per il trattamento di disturbi immunologici o iperproliferativi".

Mark Zak et al. descrivono "la scoperta basata sulla struttura di una porzione C-2 idrossietilica che forniva livelli costantemente elevati di selettività per JAK1 rispetto a JAK2 alla serie imidazopirrolpiridinica degli inibitori di JAK1" in 'Identification of C -2 Hydroxyethyl Imidazopyrrolo-pyridines as Potent JAK1 inhibitors with Favourable Physicochemical Properties and High Selectivity over JAK2', Journal of Medicinal Chemistry, vol. 56, no. 11, 31 maggio 2013, pagine 4764-4785.

BREVE SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ai seguenti composti:

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2H-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetraidro-2H-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1H-pirazol-4-il)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1H-pirazol-3-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

sali accettabili farmaceuticamente di tali composti, e loro combinazioni.

Il termine "composti dell'invenzione" e "composto dell'invenzione" intende comprendere almeno un composto

scelto dal suddetto gruppo di composti, sia in forma priva di solvente sia in qualsiasi forma idratata e/o solvatata come illustrato nella presente.

Realizzazioni della presente invenzione si riferiscono a composti, e composizioni farmaceutiche che li contengono. Nella presente sono descritti metodi per produrli e purificarli, metodi per usarli come inibitori di JAK e metodi per usarli nel trattamento di stati di malattia, disturbi e condizioni mediate da JAK.

Realizzazioni di questa invenzione presentano effetti di inibizione pan-JAK con effetti su GI locali e effetti sistemici bassi o trascurabili. Inoltre, realizzazioni di questa invenzione con tali caratteristiche possono essere somministrate per via orale.

Nella presente è descritto un metodo per trattare un soggetto che soffre o è diagnosticato con una malattia, disturbo o condizione medica mediata da JAK usando i composti dell'invenzione o agenti attivi dell'invenzione.

Altre realizzazioni, caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalla pratica dell'invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1.

Diagramma schematico di parte del tratto gastrointestinale umano, mostrato come una immagine stirata non in scala. Il duodeno (3), il digiuno (4), e l'ileo (5) (tutti mostrati schematicamente) formano l'intestino tenue dopo lo stomaco (2) e l'esofago (1). L'intestino crasso comprende il colon (6), a sua volta comprendente il cieco (7) e l'appendice (non mostrata), colon ascendente, colon trasverso, colon discendente, colon sigmoide (ansa nello stesso non mostrata), e retto (11). Il colon trasverso è la porzione compresa tra le flessioni destra (8) e sinistra (9) del colon, il colon ascendente si estende dal cieco (7) alla flessione destra del colon (8) e il colon discendente si estende dalla flessione sinistra del colon (9) al retto (11). Vari schemi di distribuzione sono illustrati con riferimento al colon per comodità, ma possono anche riferirsi ad altre parti del tratto gastrointestinale. La distribuzione sistemica è rappresentata da frecce tratteggiate in figura 1 come permeante attraverso le pareti del colon, per scopi illustrativi, ma tale distribuzione non è limitata alle pareti del colon, potendo avvenire anche attraverso le pareti di altre parti del tratto gastrointestinale di figura 1, quali quelle dell'intestino tenue. La

distribuzione con una certa penetrazione tissutale è rappresentata da frecce a linea intera in figura 1 come penetrante nel tessuto del colon per scopi illustrativi semplificati, ma tale penetrazione non è limitata al tessuto del colon, perché può avvenire anche nel tessuto di altre parti del tratto gastrointestinale mostrato in figura 1, come il tessuto dell'intestino tenue. L'effetto di una realizzazione di un inibitore di JAK secondo questa invenzione è mostrato indicativamente come perturbante la via di segnalazione JAK/STAT che diversamente porterebbe all'infiammazione associata a una malattia infiammatoria intestinale ("IBD"), come il morbo di Crohn o la colite ulcerosa. A titolo illustrativo, ma non limitativo, un sito della malattia è mostrato illustrativamente come un sito della malattia del colon (10) nel colon discendente.

Figura 2.

Diagramma schematico che mostra la preparazione/interconversione di realizzazioni del composto Ex. 1.

Figura 3.

Stratificazione di modelli di diffrazione di raggi X da polvere ad alta resa (HT-XRPD) per le seguenti realizzazioni del composto Ex. 1, dal basso verso l'alto: 1s, 2 (ottenuto per equilibratura a temperatura ambiente in 1,4-diossano), 3b (ottenuto mediante cicli termici in cicloesano), 1b+4 (ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di μL in metanolo/acqua (50/50, v/v), 5 (ottenuto mediante cicli termici in cloroformio), 6 (ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di mL in acetonitrile), 7 (ottenuto da 1s+7, a sua volta ottenuto mediante equilibratura del solvente in eptano), 7 (ottenuto mediante dissoluzione di 1s+7, a sua volta ottenuto mediante equilibratura del solvente in eptano), 8 (ottenuta mediante desolvatazione della realizzazione 5 mediante calorimetria a scansione differenziale ciclica), e 9 (ottenuto mediante desolvatazione della realizzazione 2 mediante calorimetria a scansione differenziale ciclica).

Figura 4.

Stratificazione di modelli di diffrazione di raggi X da polvere ad alta resa (HT-XRPD) per le seguenti realizzazioni del composto Ex. 1, dal basso verso l'alto: 1s (materiale iniziale), 1a (ottenuto dopo esposizione a condizioni di invecchiamento accelerato (AAC) (40°C e 70% di umidità relativa) diverse forme di campioni della realizzazione 1s), 1b (ottenuto mediante equilibratura in solvente a temperatura ambiente in toluene), 1c

(ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di μL in etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v)), 1d (ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di μL in acetonitrile/cloroformio (50/50, v/v)), 1e (ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di μL in etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v)), 1f (ottenuto mediante equilibratura in solvente a temperatura ambiente in p-xilene), 1g (ottenuto mediante equilibratura in solvente a 50°C in anisolo), 1h (ottenuto mediante cristallizzazione per raffreddamento a scala di μL in p-xilene).

Figura 5.

Stratificazione di modelli di diffrazione di raggi X da polvere ad alta resa (HT-XRPD) per le seguenti realizzazioni del composto Ex. 1, dal basso verso l'alto: 1s, 3b (ottenuto per cicli termici in cicloesano), 3c (ottenuto per cristallizzazione per raffreddamento su scala μL in 1,4-diossano), 3d (ottenuto per cristallizzazione per raffreddamento su scala di μL in tetraidrofurano), e 3e (ottenuto per cicli termici in isobutanolo).

Figura 6.

Diffrattogrammi HR-XRPD della realizzazione 1s nella sua forma iniziale ("1s"), dopo una esposizione di quattro giorni a 40°C e 70% di umidità relativa ("1s 70 RH"), e dopo una esposizione di quattro giorni a 25°C e 100% di umidità relativa ("10").

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Come qui usati, i termini "incluso", "contenente" e "comprendente" sono usati nel loro senso aperto, non limitativo.

Qualsiasi formula qui fornita è destinata a rappresentare composti aventi strutture rappresentate dalla formula strutturale come pure certe variazioni o forme. Alcune strutture possono esistere come tautomeri. Inoltre, come parti di questa invenzione sono anche previste una forma amorfa, idrati, solvati, polimorfi e pseudopolimorfi di tali composti di questa invenzione e loro miscele. Realizzazioni di questa invenzione sono in forma priva di solvente o in qualsiasi forma idratata e/o solvatata come illustrato nella presente.

Il riferimento a un composto nella presente significa un riferimento a una qualsiasi di: (a) la forma effettivamente descritta di tale composto, e (b) qualsiasi delle forme di tale composto nel mezzo in cui il composto viene

considerato quando denominato. Per esempio, il riferimento nella presente ad un composto come R-COOH, comprende il riferimento ad uno qualsiasi di, per esempio, R-COOH_(s), R-COOH_(sol) e R-COO⁻_(sol). In questo esempio, R-COOH_(s) si riferisce al composto solido, come può essere ad esempio in una compressa o qualche altra composizione o preparazione farmaceutica solida; R-COOH_(sol) si riferisce alla forma indissociata del composto in un solvente; e R-COO⁻_(sol) si riferisce alla forma dissociata del composto in un solvente, come la forma dissociata del composto in un ambiente acquoso, sia che tale forma dissociata derivi da R-COOH, da un suo sale, o da qualsiasi altra entità che fornisca R-COO⁻ alla dissociazione nel mezzo considerato. In un altro esempio, un'espressione come "esporre un'entità al composto di formula R-COOH" si riferisce all'esposizione di tale entità alla forma, o forme, del composto R-COOH che esiste, o esistono, nel mezzo in cui tale esposizione avviene. In ancora un altro esempio, una espressione come "far reagire un'entità con un composto di formula R-COOH" si riferisce alla reazione di (a) tale entità nella forma, o forme, chimicamente rilevanti, di tale entità che esiste, o esistono, nel mezzo in cui tale reazione avviene, con (b) la forma, o forme, chimicamente rilevanti del composto R-COOH che esiste, o esistono, nel mezzo in cui tale reazione avviene. Al riguardo, se tale entità è ad esempio in ambiente acquoso, si intende che il composto R-COOH è in tale medesimo mezzo, e quindi l'entità viene esposta a specie come R-COOH_(aq) e/o R-COO⁻_(aq), dove il pedice "(aq)" sta per "acquoso" secondo il suo significato convenzionale in chimica e biochimica. Un gruppo funzionale di acido carbossilico è stato scelto in questi esempi di nomenclatura; questa scelta non è tuttavia intesa come limitazione ma è semplicemente una illustrazione. Si comprenderà che esempi analoghi possono essere forniti in termini di altri gruppi funzionali, inclusi ma non limitati a, elementi azotati basici, come quelli in ammine, e qualsiasi altro gruppo che interagisce o si trasforma secondo modalità note nel mezzo che contiene il composto. Tali interazioni e trasformazioni includono, ma non sono limitate a, dissociazione, associazione, tautomeria, solvolisi, compresa idrolisi, solvatazione, compresa idratazione, protonazione, e deprotonazione. Nessun ulteriore esempio a questo riguardo è fornito qui poiché queste interazioni e trasformazioni in un dato mezzo sono note ad un qualsiasi esperto nella tecnica.

Qualsiasi formula qui fornita è anche destinata a rappresentare forme non marcate come pure forme isotopiche

dei composti. I composti marcati isotopicamente hanno strutture rappresentate dalle formule qui fornite eccetto che uno o più atomi sono sostituiti da un atomo avente una massa atomica o numero di massa selezionato in forma arricchita. Esempi di isotopi che possono essere incorporati nei composti dell'invenzione in una forma che supera le abbondanze naturali includono isotopi di idrogeno, carbonio, azoto e ossigeno, come ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , e ^{17}O , rispettivamente. Tali composti isotopici sono utili in studi metabolici (preferibilmente con ^{14}C), studi cinetici di reazione (con, ad esempio, deuterio (cioè, D oppure ^2H); o trizio (cioè, T o ^3H)), tecniche di rilevamento o visualizzazione [come tomografia a emissione di positroni (PET) o tomografia computerizzata a emissione a singolo fotone (SPECT)] che includono saggi di distribuzione in tessuti di farmaci o substrati, o nel trattamento radioattivo di pazienti. In particolare, un composto marcato con ^{18}F o ^{11}C può essere particolarmente preferito per studi PET o SPECT. Inoltre, sostituzione con isotopi più pesanti come il deuterio (cioè ^2H) può fornire alcuni vantaggi terapeutici derivanti da una maggiore stabilità metabolica, per esempio un aumento locale, della emivita *in vivo* o requisiti di dosaggio ridotti. I composti marcati isotopicamente di questa invenzione possono generalmente essere preparati eseguendo le procedure descritte negli schemi o negli esempi e nelle preparazioni descritte di seguito sostituendo un reagente marcato isotopicamente facilmente disponibile ad un reagente non marcato isotopicamente.

"Tautomeri" si riferiscono a composti che sono forme intercambiabili di una particolare struttura di composti, e che variano nello spostamento di atomi di idrogeno e elettroni. Così, due strutture che hanno un membro H in posizioni differenti possono essere in equilibrio soddisfacendo le regole di valenza. Per esempio, enoli e chetoni sono tautomeri poiché essi sono rapidamente interconvertiti mediante trattamento con acido o base.

Quando si fa riferimento a qualsiasi formula qui fornita, la selezione di una particolare porzione da una lista di possibili specie per una variabile specificata non è destinata a definire la stessa scelta della specie per la variabile che appare altrove. In altre parole, quando una variabile appare più di una volta, la scelta della specie da una lista specificata è indipendente dalla scelta della specie per la stessa variabile altrove nella formula, se non indicato altrimenti.

A titolo di primo esempio sulla terminologia dei sostituenti, se il sostituito S^1_{esempio} è uno di S_1 e S_2 , e il

sostituente S^2_{esempio} è uno di S_3 e S_4 , allora tali assegnazioni fanno riferimento a realizzazioni di questa invenzione date secondo le scelte S^1_{esempio} è S_1 e S^2_{esempio} è S_3 ; S^1_{esempio} è S_1 e S^2_{esempio} è S_4 ; S^1_{esempio} è S_2 e S^2_{esempio} è S_3 ; S^1_{esempio} è S_2 e S^2_{esempio} è S_4 ; ed equivalenti di ognuna di tali scelte. La terminologia più corta " S^1_{esempio} è uno di S_1 e S^2_{esempio} è uno di S_3 e S_4 " viene pertanto qui usata per brevità, ma non per limitazione. Il primo esempio precedente sulla terminologia dei sostituenti, che è indicato in termini generici, è destinato ad illustrare le varie assegnazioni di sostituenti qui descritte.

Inoltre, quando più di una assegnazione è data per qualsiasi membro o sostituente, realizzazioni di questa invenzione comprendono i vari raggruppamenti che possono essere realizzati dalle assegnazioni elencate, prese indipendentemente, e loro equivalenti. A titolo di secondo esempio sulla terminologia dei sostituenti, se è qui descritto che il sostituente S_{esempio} è uno di S_1 , S_2 , e S_3 , questo elenco si riferisce a realizzazioni di questa invenzione per cui S_{esempio} è S_1 ; S_{esempio} è S_2 ; S_{esempio} è S_3 ; S_{esempio} è uno di S_1 e S_2 ; S_{esempio} è uno di S_1 e S_3 ; S_{esempio} è uno di S_2 e S_3 ; S_{esempio} è uno di S_1 , S_2 e S_3 ; e S_{esempio} è qualsiasi equivalente di ognuna di queste scelte. La terminologia più corta " S_{esempio} è uno di S_1 , S_2 , e S_3 " viene pertanto qui usata per brevità, ma non per limitazione. Il secondo esempio precedente sulla terminologia dei sostituenti, che è indicato in termini generici, è destinato ad illustrare le varie assegnazioni di sostituenti qui descritte.

I seguenti inibitori di JAK sono realizzazioni illustrative dell'invenzione:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianonietil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(tetraidro-2H-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*((tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide; e

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide.

Altre realizzazioni dell'invenzione sono sali accettabili farmaceuticamente di composti indicati sopra.

Realizzazioni aggiuntive dell'invenzione sono composizioni farmaceutiche comprendenti ciascuna una quantità efficace di almeno uno dei composti sopra riportati o un loro sale accettabile farmaceuticamente.

Un "sale accettabile farmaceuticamente" è un sale di un composto che è non tossico, biologicamente tollerabile o altrimenti biologicamente adatto per la somministrazione al soggetto. Si veda, in generale, S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977), e Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, Stahl and Wermuth, Ed.s., Wiley-VCH and VHCA, Zurich, 2002. I composti dell'invenzione possono possedere un gruppo sufficientemente acido, un gruppo sufficientemente basico, o entrambi i tipi di gruppi funzionali, e di conseguenza reagire con un certo numero di basi inorganiche o organiche, e acidi inorganici ed organici, per formare un sale accettabile farmaceuticamente. Esempi di sali accettabili farmaceuticamente comprendono solfati, pirosofati, bisolfati, solfiti, bisolfiti, fosfati, monoidrogenofosfati,

diidrogenofosfati, metafosfati, pirofosfati, cloruri, bromuri, ioduri, acetati, propionati, decanoati, caprilati, acrilati, formiati, isobutirradi, caproati, eptanoati, propilati, ossalati, malonati, succinati, suberati, sebacati, fumarati, maleati, butin-1,4-dioati, esin-1,6-dioati, benzoati, clorobenzoati, metilbenzoati, dinitrobenzoati, idrossibenzoati, metossibenzoati, ftalati, solfonati, xilensolfonati, fenilacetati, fenilpropionati, fenilbutirradi, citrati, lattati, γ -idrossibutirradi, glicolati, tartrati, metansolfonati, propansolfonati, naftalen-1-solfonati, naftalen-2-solfonati, e mandelati.

Se il composto dell'invenzione contiene almeno un azoto basico, il sale accettabile farmaceuticamente desiderato può essere preparato mediante qualsiasi metodo adatto disponibile nella tecnica, per esempio, trattamento della base libera con un acido inorganico, come acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido solfamminico, acido nitrico, acido borico e acido fosforico oppure con un acido organico, come acido acetico, acido fenilacetico, acido propionico, acido stearico, acido lattico, acido ascorbico, acido maleico, acido idrossimaleico, acido isoetionico, acido succinico, acido valerico, acido fumarico, acido malonico, acido piruvico, acido ossalico, acido glicolico, acido salicilico, acido oleico, acido palmitico, acido laurico, un acido piranosidilico, come acido glucuronico o acido galatturonico, un acido alfa-idrossilico, come acido mandelico, acido citrico, o acido tartarico, un amminoacido, come acido aspartico o acido glutammico, un acido aromatico come acido benzoico, acido 2-acetossibenzoico, acido naftoico o acido cinnamico, acido solfonico, come acido laurilsolfonico, acido p-toluensolfonico, acido metansolfonico, acido etansolfonico, qualsiasi miscela compatibile di acidi come quelli qui riportati, e qualsiasi altro acido e loro miscela che siano considerati equivalenti o sostituti accettabili alla luce del normale livello di esperienza in questa tecnologia.

Non tutte le realizzazioni di sali accettabili farmaceuticamente di composti secondo questa invenzione possono essere ugualmente adatte per il loro sviluppo, in quanto composti che sono sufficientemente debolmente basici (*ad esempio*, pKa di circa 4) potrebbero non formare sali sufficientemente stabili ai fini dello sviluppo. Si veda ad esempio, G.A. Stephenson, et al., J. Pharm. Sciences 100(5), 1607-17 (2011) "Physical stability of salts of weak bases in the solid state". Alcune realizzazioni di questa invenzione sono destinate a comprendere forme co-cristallizzate di un composto secondo questa invenzione con un adatto formatore di co-cristalli. Progettazione e

proprietà di co-cristalli per uso farmaceutico e metodi per produrli e caratterizzarli sono forniti, per esempio, in N. Shan, et al., *Drug Discovery Today*, 13(9/10), 440-46 (2008) "The role of cocrystals in pharmaceutical science"; N. Qiao, et al., *Intl. J. Pharmaceutics*, 419, 1-11 (2011) "Pharmaceutical cocrystals: An overview"; R. Thakuria, et al., *Intl. J. Pharmaceutics*, 453, 101-25 (2013) "Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs". I composti dell'invenzione, inclusi i loro sali accettabili farmaceuticamente, da soli o in combinazione, (complessivamente, "agente attivo" o "agenti attivi") sono utili come inibitori di JAK nei metodi dell'invenzione. Tali metodi per modulare l'attività JAK comprendono l'esposizione di JAK ad una quantità efficace di almeno un composto chimico dell'invenzione.

L'inibitore di JAK può essere usato in un soggetto diagnosticato con o affetto da una malattia, disturbo o condizione medica mediata attraverso l'attività di JAK, come quelli descritti nella presente. Si intende che i sintomi o gli stati patologici siano inclusi nell'ambito di "malattie, disturbi o condizioni mediche".

Di conseguenza, gli agenti attivi qui descritti possono essere usati per trattare soggetti diagnosticati con o affetti da una malattia, un disturbo o una condizione medica mediata da JAK. Il termine "trattare" o "trattamento" come qui usato è inteso riferirsi alla somministrazione di un agente attivo o composizione dell'invenzione a un soggetto allo scopo di influenzare un beneficio terapeutico o profilattico attraverso modulazione di JAK. Il trattamento comprende l'invertire, migliorare, alleviare, inibire il progresso, diminuire la gravità, ridurre o prevenire una malattia, un disturbo o una condizione, o uno o più sintomi di tale malattia, disturbo o condizione mediata attraverso modulazione dell'attività di JAK. Il termine "soggetto" si riferisce ad un paziente mammifero che necessita di tale trattamento, come un essere umano. Il termine "inibitori" o "inibitore" si riferisce a composti che diminuiscono, impediscono, inattivano, desensibilizzano o sotto-regolano l'espressione o attività di JAK.

Realizzazioni di questa invenzione forniscono inibitori di JAK per la prevenzione e/o la regolazione della risposta infiammatoria eccessiva. Realizzazioni di inibitori di JAK secondo questa invenzione sono inibitori pan-JAK.

Salvo indicazione contraria, il termine "proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK" si riferisce alle corrispondenti proprietà denominate come segue:

come riportato nella descrizione per i composti Ex. 1 - 12, nel caso di masse molari;

come determinato in base alle rispettive definizioni, per numero di donatori, accettori di legami H e legami a rotazione; e

come misurato in riferimento alla Tabella 1a, colonna 2, nel caso di concentrazioni plasmatiche, e Tabella 7, colonne 3 e 4, nel caso dei coefficienti di permeabilità A-B in presenza di inibitore di P-gp e coefficienti di permeabilità B-A.

Nella presente sono descritti metodi per inibire JAK, comprendenti l'esperre un recettore JAK ad un inibitore di JAK che è caratterizzato dal fatto di avere le seguenti proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK: una concentrazione plasmatica nell'intervallo da circa 0,1 ng/ml a circa 60 ng/ml, cLog P nell'intervallo da circa 0,1 a circa 2,8, coefficienti di permeabilità A-B in presenza di un inibitore P-gp nell'intervallo da circa 0,1 a circa 2,5, coefficienti di permeabilità B-A nell'intervallo da circa 0,5 a circa 20, tPSA nell'intervallo da circa 85 a circa 120.

Nei metodi di inibizione di JAK, la concentrazione plasmatica è nell'intervallo da circa 10 ng/ml a circa 20 ng/ml.

Nei metodi di inibizione di JAK, il cLogP è nell'intervallo da circa 0,8 a circa 1,4.

Nei metodi di inibizione di JAK, il coefficiente di permeabilità A-B in presenza di un inibitore di P-gp è nell'intervallo da circa 0,6 a circa 1,5.

Nei metodi di inibizione di JAK, il coefficiente di permeabilità B-A è nell'intervallo da circa 0,5 a circa 5.

Nei metodi di inibizione di JAK, il tPSA è compreso tra circa 100 e circa 120.

Nella presente sono descritti metodi per inibire JAK, comprendenti l'esperre un recettore JAK ad un inibitore di JAK che è inoltre caratterizzato dal fatto di avere le seguenti proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK: una massa molare nell'intervallo da circa 300 g mol⁻¹ circa 500 g mol⁻¹, un numero di donatori di legami a idrogeno nell'intervallo da circa 2 a circa 3, un numero di accettori di legami a idrogeno nell'intervallo da circa 4 a circa 5, e un numero di legami a rotazione nell'intervallo da circa 3 a circa 6, oltre alle concentrazioni plasmatiche, valori di clogP, coefficienti di permeabilità, e valori di tPSA descritti sopra per metodologie di inibizione di JAK

secondo questa invenzione.

Nei metodi di inibizione di JAK, la massa molare è compresa nell'intervallo di circa 340 g mol⁻¹ a circa 430 g mol⁻¹.

Nei metodi di inibizione di JAK, il numero di legami a rotazione è nell'intervallo da circa 5 a circa 6.

Realizzazioni di questa invenzione possono essere usate in metodi per trattare infiammazione nel tratto gastrointestinale di un soggetto, comprendenti la somministrazione a un soggetto di una quantità farmaceuticamente efficace di un inibitore di JAK che è caratterizzato dal fatto di avere le seguenti proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK: una concentrazione plasmatica nell'intervallo da circa 0,1 ng/ml a circa 60 ng/ml, cLog P nell'intervallo da circa 0,1 a circa 2,8, coefficienti di permeabilità A-B in presenza di un inibitore di P-gp nell'intervallo da circa 0,1 a circa 2,5, coefficienti di permeabilità B-A nell'intervallo da circa 0,5 a circa 20, tPSA nell'intervallo da circa 85 a circa 120.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, la concentrazione plasmatica è nell'intervallo da circa 10 ng/ml a circa 20 ng/ml.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, il cLogP è nell'intervallo da circa 0,8 a circa 1,4.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, il coefficiente di permeabilità A-B è in presenza di un inibitore di P-gp è nell'intervallo da circa 0,6 a circa 1,5.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, il coefficiente di permeabilità B-A è compreso nell'intervallo da circa 0,5 a circa 5.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, la tPSA è nell'intervallo da circa 100 a circa 120.

Nella presente sono descritti metodi per il trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale di un soggetto in cui le proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK sono inoltre caratterizzate dall'aver le seguenti proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK: una massa molare nell'intervallo da circa 300 g mol⁻¹ a circa 500 g mol⁻¹, un numero di donatori di legami a idrogeno nell'intervallo da circa 2 a circa 3, un numero di accettori di

legami a idrogeno nell'intervallo da circa 4 a circa 5, e un numero di legami a rotazione nell'intervallo da circa 3 a circa 6, oltre alle concentrazioni plasmatiche, valori di cLogP, coefficienti di permeabilità, e valori di tPSA descritti sopra per le metodologie di trattamento dell'infiammazione secondo la presente invenzione.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, la massa molare è nell'intervallo da circa 350 g mol⁻¹ a circa 430 g mol⁻¹.

Nei metodi di trattamento dell'infiammazione nel tratto gastrointestinale, il numero di legami a rotazione è nell'intervallo da circa 5 a circa 6.

Nella presente sono descritti inibitori di JAK aventi le seguenti proprietà chimico-fisiche di JAK: una concentrazione plasmatica nell'intervallo da circa 0,1 ng/ml a circa 60 ng/ml, una cLogP nell'intervallo da 0,1 a circa 2,8, un coefficiente di permeabilità A-B in presenza di un inibitore di P-gp nell'intervallo da circa 0,1 a circa 2,5, un coefficiente di permeabilità B-A nell'intervallo da circa 0,5 a circa 20, e una tPSA nell'intervallo da circa 85 a circa 120.

Inoltre nella presente sono descritti inibitori di JAK aventi una concentrazione plasmatica che varia da circa 10 ng/ml a circa 20 ng/ml.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi valori di cLogP nell'intervallo da circa 0,8 a circa 1,4.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi un coefficiente di permeabilità A-B in presenza di un inibitore di P-gp nell'intervallo da circa 0,6 a circa 1,5.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi un coefficiente di permeabilità B-A compreso tra circa 0,5 e circa 5.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi valori di tPSA nell'intervallo da circa 100 a circa 120.

Nella presente sono descritti inibitori di JAK aventi le seguenti proprietà chimico-fisiche dell'inibitore di JAK: una massa molare nell'intervallo da circa 300 g mole⁻¹ circa 500 g mole⁻¹, un numero di donatori di legami a idrogeno da circa 2 a circa 3, un numero di accettori di legami a idrogeno da circa 4 a circa 5, e un numero di legami a rotazione da circa 3 a circa 6 in aggiunta alle concentrazioni plasmatiche, valori di cLogP, coefficienti di permeabilità, e valori di tPSA descritti sopra per inibitori di JAK secondo questa invenzione.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi una massa molare nell'intervallo da circa 350 g mol⁻¹ a circa 430 g mol⁻¹.

Nella presente sono inoltre descritti inibitori di JAK aventi un numero di legami a rotazione è nell'intervallo da circa 5 a circa 6.

Nei metodi di trattamento, una quantità efficace di almeno un agente attivo secondo l'invenzione può essere somministrata ad un soggetto che soffre o è diagnosticato come avente tale malattia, disturbo o condizione medica. Una "quantità efficace" indica una quantità o dose sufficiente ad ottenere generalmente il vantaggio terapeutico o profilattico desiderato nei pazienti che necessitano di tale trattamento per la malattia, disturbo o condizione medica designata. Quantità o dosi efficaci degli agenti attivi della presente invenzione possono essere accertate mediante metodi di routine come modellazione, studi di aumento della dose o prove cliniche e tenendo in considerazione fattori di routine, per esempio la modalità o la via di somministrazione o il rilascio di farmaci, le farmacocinetiche dell'agente, la gravità e il decorso della malattia, disturbo o condizione, la terapia precedente o in corso del soggetto, lo stato di salute del soggetto e la risposta a farmaci e la valutazione del medico curante. Per un essere umano di 70 kg, un intervallo illustrativo per una quantità di dosaggio adatta è da circa 1 a 1000 mg/giorno in unità di dosaggio singole o multiple.

Realizzazioni di questa invenzione sono nuovi inibitori di JAK come sostanze attive per la prevenzione e/o la regolazione di eccessiva risposta infiammatoria e i cui effetti sistemici sono eliminati o ridotti. Altre realizzazioni della presente invenzione sono inibitori di JAK con effetti locali sui tessuti gastro-intestinali per il trattamento di condizioni quali, ma non limitati a, IBD, senza causare effetti sistemici o con tali effetti sistemici accettabilmente ridotti.

Realizzazioni di questa invenzione sono inibitori di JAK a bassa permeabilità. Altre realizzazioni di questa invenzione sono inibitori di JAK che hanno solubilità acquosa.

Una volta che si è verificato il miglioramento della malattia, disturbo o condizione del paziente, la dose può essere regolata per il trattamento preventivo o di manutenzione. Per esempio, il dosaggio o la frequenza di somministrazione, o entrambi, possono essere ridotti in funzione dei sintomi, ad un livello al quale viene

mantenuto l'effetto terapeutico o profilattico desiderato. Naturalmente, se i sintomi sono stati alleviati ad un livello appropriato, il trattamento può cessare. I pazienti possono, tuttavia, richiedere un trattamento intermittente su base a lungo termine a seguito di qualsiasi recidiva di sintomi.

Inoltre, i composti dell'invenzione sono previsti per l'uso da soli, in combinazione con uno o più di altri composti di questa invenzione, o in combinazione con ingredienti attivi addizionali nel trattamento delle condizioni discusse sotto. Gli ingredienti attivi addizionali possono essere somministrati separatamente con almeno un composto dell'invenzione, con agenti attivi dell'invenzione o inclusi con tale agente in una composizione farmaceutica secondo l'invenzione. In una realizzazione illustrativa, ingredienti attivi addizionali sono quelli che sono noti o trovati essere efficaci nel trattamento di condizioni, disturbi o malattie mediate dall'attività di JAK, come un altro inibitore di JAK o un composto attivo contro un altro bersaglio associato con la particolare condizione, disturbo o malattia. La combinazione può servire per aumentare l'efficacia (ad esempio includendo nella combinazione un composto che aumenta la potenza o l'efficacia di un agente secondo l'invenzione), diminuire uno o più effetti collaterali, o diminuire la dose richiesta dell'agente attivo secondo l'invenzione.

Quando si fa riferimento all'inibizione del bersaglio, una "quantità efficace" significa una quantità sufficiente ad influenzare l'attività di almeno una della famiglia di proteine JAK. La misurazione dell'attività del bersaglio può essere effettuata mediante metodi analitici ordinari.

Gli agenti attivi dell'invenzione sono previsti per l'uso, da soli o in combinazione con uno o più ingredienti attivi addizionali, per formulare composizioni farmaceutiche dell'invenzione. Una composizione farmaceutica dell'invenzione comprende una quantità efficace di almeno un agente attivo secondo l'invenzione.

Eccipienti accettabili farmaceuticamente comunemente usati in composizioni farmaceutiche sono sostanze che sono non tossiche, biologicamente tollerabili, e altrimenti biologicamente adatte per la somministrazione a un soggetto, come una sostanza inerte, aggiunte a una composizione farmacologica o altrimenti usate come veicolo, vettore o diluente per facilitare la somministrazione di un agente e che è compatibile con esso. Esempi di tali eccipienti includono carbonato di calcio, fosfato di calcio, vari zuccheri e tipi di amido, derivati di cellulosa, gelatina, oli vegetali e polietilenglicoli.

Forme di rilascio delle composizioni farmaceutiche contenenti una o più unità di dosaggio degli agenti attivi possono essere preparate usando eccipienti e tecniche di miscelazione accettabili farmaceuticamente note o che diventano disponibili agli ordinari esperti nella tecnica. Le composizioni possono essere somministrate nei metodi dell'invenzione mediante una via di somministrazione adatta, *ad esempio*, per via orale, parenterale, rettale, topica, oculare, o per inalazione.

La preparazione può essere in forma di compresse, capsule, bustine, confetti, polveri, granuli, pastiglie, polveri per ricostituzione, preparazioni liquide o supposte. Le composizioni possono essere formulate per una qualsiasi di una pluralità di vie di somministrazione, come infusione endovenosa, iniezione sottocutanea, somministrazione topica o somministrazione orale. Preferibilmente, le composizioni possono essere formulate per la somministrazione orale.

Per la somministrazione orale, gli agenti attivi dell'invenzione possono essere forniti sotto forma di compresse, capsule o perle, o come soluzione, emulsione o sospensione. Per preparare le composizioni orali, gli agenti attivi possono essere formulati in modo da fornire un dosaggio, *ad esempio* per un essere umano di 70-kg, da circa 1 a 1000 mg/giorno in unità di dosaggio singole o multiple come intervallo illustrativo.

Le compresse orali possono comprendere l'ingrediente(i) attivo miscelato con eccipienti accettabili farmaceuticamente compatibili come diluenti, agenti disintegranti, agenti leganti, agenti lubrificanti, agenti dolcificanti, agenti aromatizzanti, agenti coloranti e agenti conservanti. Adatti riempitivi inerti comprendono carbonato di sodio e calcio, fosfato di sodio e calcio, lattosio, amido, zucchero, glucosio, metilcellulosa, stearato di magnesio, mannitolo, sorbitolo e simili. Eccipienti orali liquidi illustrativi comprendono etanolo, glicerolo, acqua e simili. Amido, polivinil-pirrolidone (PVP), sodio amido glicolato, cellulosa microcristallina e acido alginico sono esempi di agenti disintegranti. Agenti leganti possono includere amido e gelatina. L'agente lubrificante, se presente, può essere stearato di magnesio, acido stearico o talco. Se desiderato, le compresse possono essere rivestite con un materiale come gliceril monostearato o gliceril distearato per ritardare l'assorbimento nel tratto gastrointestinale, o possono essere rivestite con un rivestimento enterico. Un rivestimento addizionale che può essere usato comprende rivestimenti che sono progettati per rilasciare il

composto o agente attivo in funzione del tempo, del pH o del contenuto batterico.

Le capsule per somministrazione orale comprendono capsule di gelatina dura e molle o capsule di (idrossipropil)metil cellulosa. Per preparare capsule di gelatina dura, l'ingrediente(i) attivo può essere miscelato con un diluente solido, semisolido, o liquido. Capsule di gelatina molle possono essere preparate miscelando l'ingrediente attivo con un olio come olio di arachidi o olio di oliva, paraffina liquida, una miscela di mono e digliceridi di acidi grassi a catena corta, polietilenglicole 400 o propilenglicole. I liquidi per somministrazione orale possono essere sotto forma di sospensioni, soluzioni, emulsioni o sciroppi oppure possono essere liofilizzati o presentati come un prodotto secco per la ricostituzione con acqua o altro veicolo adatto prima dell'uso. Tali composizioni liquide possono opzionalmente contenere: eccipienti accettabili farmaceuticamente come agenti sospendenti (per esempio, sorbitolo, metilcellulosa, alginato di sodio, gelatina, idrossietilcellulosa, carbosimetilcellulosa, gel di stearato di alluminio e simili); veicoli non acquosi, per esempio, olio (per esempio, olio di mandorle o olio di noce di cocco frazionato), propilenglicole, alcol etilico, o acqua; conservanti (per esempio, metil o propil p-idrossibenzoato o acido sorbico); agenti bagnanti come lecitina; e, se desiderato, agenti aromatizzanti o coloranti.

Gli agenti attivi di questa invenzione possono anche essere somministrati mediante vie non orali. Per esempio, le composizioni possono essere formulate per la somministrazione rettale come una supposta, clistere o schiuma. Per uso parenterale, incluse le vie endovenose, intramuscolari, intraperitoneali o sottocutanee, gli agenti dell'invenzione possono essere forniti in soluzioni o sospensioni acquose sterili, tamponate ad un pH appropriato e isotoniche oppure in olio accettabile per via parenterale. Adatti veicoli acquosi includono soluzione di Ringer e cloruro di sodio isotoniche. Tali forme possono essere presentate in forma a dose unitaria come fiale o dispositivi di iniezione monouso, in forme a dose multipla come fiale da cui la dose appropriata può essere estratta, o in una forma solida o pre-concentrata che può essere usata per preparare una formulazione iniettabile. Dosi di infusione illustrative variano da circa 1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minuto}$ di agente miscelato con un veicolo farmaceutico in un periodo che varia da diversi minuti a diversi giorni.

Per la somministrazione topica, gli agenti possono essere miscelati con un veicolo farmaceutico ad una

concentrazione da circa 0,01% a circa 20% di farmaco su veicolo, preferibilmente dallo 0,1% al 10%. Un altro modo di somministrazione degli agenti dell'invenzione può usare una formulazione a cerotto per effettuare il rilascio transdermico.

Agenti attivi possono alternativamente essere somministrati in procedimenti della presente invenzione mediante inalazione, per via nasale o orale, per esempio in una formulazione a spruzzo contenente anche un veicolo adatto.

Realizzazioni dell'invenzione possono essere usate in un metodo di trattamento di un soggetto che soffre o è diagnosticato con una malattia, disturbo o condizione medica mediata da JAK, comprendente la somministrazione al soggetto che necessita di tale trattamento di una quantità efficace dell'agente attivo.

In alcuni metodi, la malattia, disturbo o condizione medica è una malattia infiammatoria intestinale, come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa.

Realizzazioni di questa invenzione possono essere usate in un metodo per modulare l'attività di JAK, compreso quando tale chinasi è in un soggetto, comprendente l'esporre JAK ad una quantità efficace di almeno un composto scelto tra i composti dell'invenzione.

I composti dell'invenzione sono utili come inibitori di JAK che possono essere somministrati per via orale e specificamente si distribuiscono nel tessuto intestinale mantenendo al contempo esposizioni sistemiche basse. Questo è in contrasto con la maggior parte degli inibitori di JAK noti che vengono somministrati per via orale e si distribuiscono a molti tessuti per il fatto che hanno una estesa esposizione sistemica.

Tabella 1a e Tabella 1b mostrano i risultati di esperimenti *in vivo*. Questi risultati comprendono concentrazioni plasmatiche e in tessuto del colon per quindici composti che sono stati somministrati a topi come descritto nei protocolli 1, 2 o 3. I risultati della concentrazione plasmatica e nel colon sono stati ottenuti seguendo il protocollo 1 impiegando puntura venosa per prelievo in vena metatarsale dorsale per i Composti (B), (C) e gli Esempi 6 e 11. I risultati della concentrazione plasmatica e in colon sono stati ottenuti seguendo il protocollo 2 usando prelievo retro-orbitale per i Composti (A), e gli Esempi 1, e 3-5 e il protocollo 2 usando puntura venosa in vena metatarsale dorsale per gli Esempi 2, 7-10 e 12. I risultati dei protocolli 1 e 2 sono riportati nella tabella

1a. I risultati della concentrazione plasmatica e colon sono stati ottenuti seguendo il protocollo 3 per gli Esempi 1,3 e 4. I risultati del protocollo 3 sono riportati nella tabella 1b. Questi protocolli sono descritti qui di seguito sotto il titolo Studi *In vivo*.

Tabella 1a. Risultati di Esperimenti in vivo dopo dosaggio p.o. - Concentrazione media dei composti di prova

Composto di prova	Concentrazione plasmatica Dopo dosaggio p.o. (ng/mL)						Concentrazione in colon Dopo dosaggio p.o. (ng/g)	
	Tempo = 0.5 h		Tempo = 2 h		Tempo = 4 h		Tempo = 4 h	
	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard
A	347,0	78,5	69,1	40,8	84,5	25,5	895,0	260,6
B	352,7	85,7	66,3	26,2	11,3	3,7	6076,7	3125,8
C	547,0	71,4	130,2	63,7	16,7	5,9	7776,7	3500,2
Ex. 1	13,4	1,5	6,1	3,7	3,3	1,2	8591,7	10245,7
Ex. 2	24,5	3,6	4,2	1,8	1,3	0,1	7600,0	983,6
Ex. 3	41,4	15,1	3,9	0,7	1,5**	***	2147,2	1821,6
Ex. 4	12,9	1,6	7,5	2,8	3,3	1,5	4448,3	989,3
Ex. 5	31,9	5,1	8,8	1,7	6,0	1,2	5328,3	986,0
Ex. 6	18,8	20,6	3,0	0,9	1,7 [#]	##	11706,7	11305,2
Ex. 7	47,0	3,8	9,6	4,4	5,0	1,2	12008,3	9461,1
Ex. 8	43,1	8,7	5,4	0,6	2,6	0,6	7396,7	3037,3
Ex. 9	15,1	1,8	6,2	4,5	3,9	0,9	7683,3	230,9
Ex. 10	26,6	4,0	3,2	1,0	3,1	0,7	3005,0	1347,2

Composto di prova	Concentrazione plasmatica Dopo dosaggio p.o. (ng/mL)						Concentrazione in colon Dopo dosaggio p.o. (ng/g)	
	Tempo = 0.5 h		Tempo = 2 h		Tempo = 4 h		Tempo = 4 h	
	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard
Ex. 11	1,6**	***	^	^^	^	^^	4785,0	1059,9
Ex. 12	15,6	8,7	4,2	1,4	2,3	1,0	5885,0	3154,1

*Media calcolata dai valori ottenuti da tre topi, se non diversamente indicato.

*La media è stata calcolata con valori ottenuti da due topi in quanto i valori ottenuti dal terzo topo erano al di sotto del limite inferiore di quantificazione.

***Non è stata calcolata alcuna deviazione standard in quanto la media è stata calcolata da soli due valori.

#Media fornita come valore ottenuto da un topo in quanto i valori ottenuti dal secondo e terzo topo erano al di sotto del limite inferiore di quantificazione.

##Nessuna deviazione standard calcolata alla luce della nota # in questa tabella.

^La media non è stata calcolata in quanto i valori per tutti e tre i topi erano inferiori al limite inferiore di quantificazione.

^^Nessuna deviazione standard calcolata alla luce della nota ^ in questa tabella.

Tabella 1b. Risultati di esperimenti in vivo dopo dosaggio i.c. - Concentrazione media dei composti di prova

Composto di prova	Concentrazione plasmatica dopo dosaggio i.c. (ng/mL)						Concentrazione in colon dopo dosaggio i.c. (ng/g)	
	Tempo = 0,5 h		Tempo = 2 h		Tempo = 4 h		Tempo = 4 h	
	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard

Composto di prova	Concentrazione plasmatica dopo dosaggio i.c. (ng/mL)						Concentrazione in colon dopo dosaggio i.c. (ng/g)	
	Tempo = 0,5 h		Tempo = 2 h		Tempo = 4 h		Tempo = 4 h	
	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard	Media*	Deviazione standard
Ex. 1	2,5 [#]	##	^	^^	^	^^	681,0	437,0
Ex. 3	1,5 [#]	##	^	^^	^	^^	227,8	254,1
Ex. 4	3,8 ^{**}	***	2,5 [#]	##	^	^^	26,1 [#]	##

*Media calcolata dai valori ottenuti da tre topi, se non diversamente indicato.

**La media è stata calcolata con valori ottenuti da due topi in quanto i valori ottenuti dal terzo topo erano al di sotto del limite inferiore di quantificazione.

***Non è stata calcolata alcuna deviazione standard in quanto la media è stata calcolata da soli due valori.

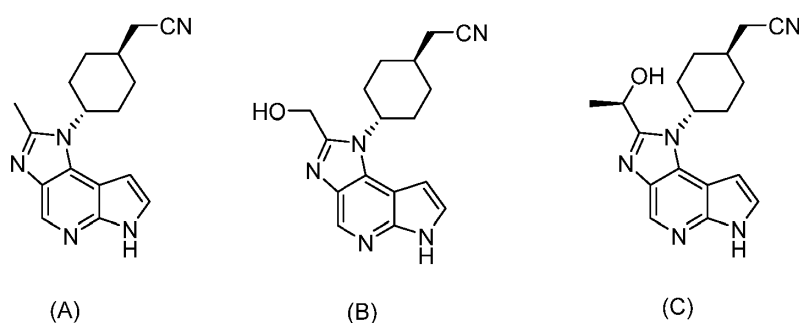
[#]Media fornita come valore ottenuto da un topo in quanto i valori ottenuti dal secondo e dal terzo topo erano al di sotto del limite inferiore di quantificazione.

##Nessuna deviazione standard calcolata alla luce della nota # in questa tabella.

^La media non è stata calcolata in quanto i valori per tutti e tre i topi erano inferiori al limite inferiore di quantificazione.

^^Nessuna deviazione standard calcolata alla luce della nota ^ in questa tabella.

I composti (A) - (C) sono i seguenti composti di riferimento che sono stati descritti in WO2013/007765 oppure WO2011/086053 per il loro uso come inibitori delle Janus chinasi:



Composti Ex. 1-12 nelle Tabelle 1a e 1b sono realizzazioni di questa invenzione fornite nei rispettivi Esempi.

Come evidenziato in Tabella 1a, concentrazioni in colon per i composti Ex. 1-12 sono risultati molto più elevati delle rispettive concentrazioni plasmatiche, con rapporti di concentrazione [colon (4 h)]:[plasma (0,5 h)] che vanno da circa 52 a circa 3.000. Al contrario, tali rapporti per i composti (A) - (C) variavano da circa 3 a circa 17. La Tabella 1b fornisce anche dati di supporto che gli Esempi 1, 3 e 4 hanno esposizioni sistemiche basse dopo il dosaggio i.c. Il contrasto tra proprietà delle realizzazioni della presente invenzione rispetto ai composti di riferimento è molto più accentuato quando il confronto è riferito ai valori di concentrazione plasmatica a 4 h. Sotto questo aspetto, il rapporto di concentrazione [colon (4 h)]:[plasma (4 h)] per i composti Ex. 1-12 variano da circa 888 a circa 6886. Al contrario, tali rapporti per i composti (A) - (C) variano da circa 11 a circa 538. Questi rapporti di concentrazione colon-plasma sono indicativi del fatto che i composti Ex. 1-12 hanno effetti sistemici bassi in qualsiasi momento dopo la somministrazione orale, mentre i composti (A) - (C) hanno effetti sistemici relativamente elevati. Questa è una osservazione inaspettata degli effetti GI locali per i composti Ex. 1-12.

Come mostrato in Tabella 4, l'attività enzimatica dei composti Ex. 1-12 è stata misurata per determinare l'attività per ciascun singolo enzima. Per tutti i composti provati, è stata misurata inibizione dell'attività enzimatica, dimostrando che questi composti sono inibitori pan-JAK. I dati riportati in questa tabella per i composti (A) - (C) dimostrano anche l'inibizione dell'attività enzimatica per tutte le proteine JAK da parte di questi composti.

Come mostrato in Tabella 5, le attività cellulari dei composti Ex. 1-12 sono state valutate in cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) usando stimoli IL-2, IFN- α e GM-CSF e misurando l'inibizione della fosforilazione di STAT5, STAT4 e STAT5, rispettivamente. Per tutti i composti provati è stata misurata

l'inibizione della fosforilazione di STAT con tutti e tre gli stimoli.

Come mostrato nella Tabella 6, le solubilità dei composti Ex. 1-12 sono state misurate in fluido gastrico simulato ("SGF") e fluido intestinale simulato ("SIF"). Tutti i composti provati hanno mostrato solubilità misurabile al di sopra di 400 μM in SGF e nell'intervallo da 81 μM a più di 400 μM con SIF. Come mostrato nella stessa tabella, questi dati di solubilità erano paragonabili alle solubilità dei composti (A) - (C).

Come mostrato nella Tabella 7, la permeabilità dei composti (A) - (C) e Ex. 1-12 è stata misurata usando la linea cellulare MDCK-MDR1 con e senza elacridar, un inibitore P-gp. Tutti i composti hanno dimostrato una bassa permeabilità per misurazioni di trasporto apicale-basolaterale, con e senza inibitore P-gp (elacridar). Valori del coefficiente di permeabilità per i composti (A) - (C) e Ex. 1-12 erano bassi e confrontabili per il trasporto apicale-basolaterale senza elacridar (per tutti questi composti) e con elacridar (per i composti (B) - (C) e i composti Ex. 1-12) (colonne 2 e 3 in tale tabella), ma i coefficienti di permeabilità basolaterale-apicale per i composti (A) - (C) erano maggiori di quelli per la maggior parte dei composti Ex. 1 - 12, come mostrato nella colonna 4 della stessa tabella. In riferimento alle colonne 3 e 4 nella Tabella 7, la maggior parte dei composti Ex. 1-12 hanno bassi coefficienti di permeabilità apicale-basolaterale misurati in presenza di elacridar (colonna 3) e anche bassi coefficienti di permeabilità basolaterale-apicale (colonna 4). Queste due caratteristiche caratterizzano composti come composti a bassa permeabilità. La stessa caratterizzazione non può essere effettuata per i composti (A) - (C) i cui coefficienti di permeabilità basolaterale-apica (colonna 4) sono maggiori di quelli per la maggior parte dei composti Ex. 1 - 12. I rapporti di efflusso forniti nella stessa tabella per i composti (A) - (C) e Ex. 1-12 mostrano che tutti questi composti sono substrati P-gp.

Non esiste un insegnamento o suggerimento di riferimento noto che indichi che la marcata mancanza di effetti sistemici per realizzazioni di questa invenzione rispetto a quelli dei composti di riferimento (A) - (C) può essere dedotta e/o predetta sulla base di confronti strutturali o altre caratteristiche dei composti (A) - (C) come quelli discussi in riferimento alle Tabelle 4, 6 e 7. Questo è così anche se i composti di riferimento (A) - (C) presentano analogie strutturali di alcune porzioni con porzioni simili delle realizzazioni di questa invenzione.

Inoltre, non è noto alcun insegnamento o suggerimento di riferimento che indichi che la caratteristica di bassa

permeabilità per realizzazioni di questa invenzione rispetto a quelle dei composti di riferimento (A) - (C) può essere dedotta e/o predetta sulla base di confronti strutturali.

I seguenti esempi specifici sono forniti per illustrare ulteriormente l'invenzione e varie realizzazioni.

Nell'ottenere i composti descritti negli esempi di seguito e i dati analitici corrispondenti, sono stati seguiti i seguenti protocolli sperimentali ed analitici se non altrimenti indicato.

Se non stabilito altrimenti, le miscele di reazione sono state sottoposte ad agitazione magnetica a temperatura ambiente (rt). Quando le soluzioni sono "essiccate", esse sono generalmente essiccate su un agente essiccante quale Na_2SO_4 o MgSO_4 . Dove miscele, soluzioni ed estratti sono stati "concentrati", essi sono stati tipicamente concentrati su un evaporatore rotante a pressione ridotta.

La cromatografia su strato sottile è stata eseguita usando lastre di gel di silice prerivestite Merck 60 F₂₅₄ 2,5 cm × 7,5 cm, 250 μm o 5,0 cm × 10,0 cm, 250 μm .

La cromatografia flash in fase normale (FCC) è stata eseguita su gel di silice (SiO_2) eluendo con 2 M di NH_3 in MeOH/DCM, se non altrimenti indicato.

Gli spettri di massa (MS) sono stati ottenuti su una serie Agilent 1100 MSD usando ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità positiva a meno che indicato diversamente. La massa calcolata (calc.) corrisponde alla massa esatta.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) sono stati ottenuti su spettrometri Bruker modello DRX. Il Formato dei dati ^1H NMR che seguono sono: spostamento chimico in ppm a campi bassi rispetto al riferimento di tetrametilsilano (molteplicità, costante di accoppiamento J in Hz, integrazione).

I nomi chimici sono stati generati da ChemDraw (Cambridge Soft, Cambridge, MA) o ACD/Name Versione 9 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canada). A titolo di esempio, la designazione (*1r,4r*) si riferisce all'orientazione trans attorno all'anello cicloesilico generato usando la funzione di designazione di Chemdraw Ultra Pro 14.0.

Per fornire una descrizione più concisa, alcune delle espressioni quantitative qui fornite non sono qualificate con il termine "circa". Si intende che, sia che il termine "circa" sia usato esplicitamente o meno, ogni quantità qui

fornita è destinata a riferirsi al valore dato effettivo, ed è anche destinata a riferirsi all'approssimazione a tale valore dato che verrà ragionevolmente dedotta in base all'ordinaria esperienza nella tecnica, inclusi equivalenti ed approssimazioni dovute alle condizioni sperimentali e/o di misurazione per tale valore dato.

Ogni qualvolta viene fornita una resa come percentuale, tale resa si riferisce ad una massa dell'entità per la quale viene fornita la resa rispetto al quantitativo massimo della stessa entità che potrebbe essere ottenuto nelle particolari condizioni stechiometriche. Le concentrazioni di reagente che sono fornite come percentuali si riferiscono a rapporti di massa, se non indicato diversamente.

Abbreviazioni ed acronimi qui usati includono i seguenti come mostrato qui di seguito:

Abbreviazioni ed acronimi definiti

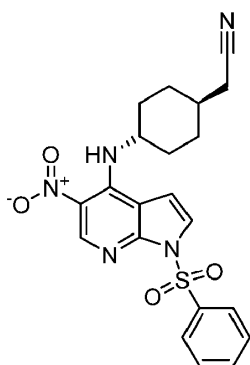
Acronimi	Termine
AAC	Condizioni di invecchiamento accelerato (40°C e 70% RH)
ACN	acetonitrile
Aq	Acquoso
br	Largo
cLogP	logP calcolato
DCM	Diclorometano
DIPEA, DIEA o base di Hunig	Diisopropilettilammina
DMA	dimetilacetammide
DMF	N,N-dimetilformammide
DMPU	1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2(1,H)-pirimidinone
DMSO	Dimetilsolfossido
EtOAc, o EA	Acetato di etile

Acronimi	Termine
EtOH	Etanolo
ESI	Ionizzazione per elettrospray
FCC	Cromatografia su colonna flash su gel di silice in fase normale
g	Grammo(i)
h	ora(e)
HPLC	Cromatografia liquida ad alta pressione
HR-XRPD	diffrazione di raggi X su polvere ad alta risoluzione
HT-XRPD	diffrazione di raggi X su polvere ad alta resa
IPA	isopropanolo
i.c.	Intra-colon
Hz	Hertz
LCMS	Cromatografia liquida e spettrometria di massa
M	Molare
m/z	Rapporto massa-carica
MeOH	Metanolo
mg	Milligrammo(i)
min	Minuto(i)
mL	Millilitro(i)
μL	Microlitro(i)

Acronimi	Termine
mmol	Millimole(i)
MTBE	Metil terz-butil etere
MS	Spettrometria di massa
NMR	Risonanza magnetica nucleare
p.o.	per os oppure per bocca
ppm	Parti per milione
PTFE	politetrafluoroetilene
PyBOP	benzotriazol-1-il-ossitripirrolidinofosfonio esafluorofosfato
PyBrOP	Bromotripirrolidinofosfonio esafluorofosfato
RH	Umidità relativa
R _t	Tempo di ritenzione
R _t o RT	Temperatura ambiente
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TLC	Cromatografia su strato sottile
tPSA	Area superficiale polare topologica

Sintesi e caratterizzazione dell'intermedio 1

2-((1*r*,4*r*)-4-(5-Nitro-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil)acetonitrile



Passaggio A: *tert*-butil N-[(1*r*,4*r*)-4-(Idrossimetil)cicloesil]carbammato. In un pallone a 4 colli da 20 L a fondo tondo spurgato e mantenuto con un'atmosfera inerte di azoto è stato posto acido (1*r*,4*r*)-4-[[*tert*-butossi)carbonil]ammino]cicloesano-1-carbossilico (1066 g, 4,38 moli, 1,00 equiv) e THF (10 L). Questo è stato seguito dall'aggiunta goccia a goccia di BH₃-Me₂S (10 M, 660 mL) a -10°C per 1 h. La soluzione risultante è stata agitata per 3 h a 15°C. Questa reazione è stata eseguita tre volte in parallelo e le miscele di reazione sono state combinate. La reazione è stata poi spenta mediante aggiunta di metanolo (2 L). La miscela risultante è stata concentrata sotto vuoto. Ne risultava *tert*-butil N-[(1*r*,4*r*)-4-(idrossimetil)cicloesil]carbammato (3000 g, 99,6%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₁₂H₂₃NO₃ 229,32; m/z osservato, 215,2 [M-*t*Bu+MeCN+H]⁺; ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 4,40 (s, 1H), 3,45 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H), 3,38 (s, 1H), 2,05-2,02 (m, 2H), 1,84-1,81 (m, 2H), 1,44 (s, 11H), 1,17-1,01 (m, 4H).

Passaggio B: *tert*-butil N-[(1*r*,4*r*)-4-[(Metansolfonilossi)metil]cicloesil]carbammato. In un pallone a 4 colli a fondo tondo da 20 L spurgato e mantenuto con una atmosfera inerte di azoto, è stato posto *tert*-butil N-[(1*r*,4*r*)-4-(idrossimetil)cicloesil]carbammato (1000 g, 4,36 moli, 1,00 equiv), diclorometano (10 L), piridina (1380 g, 17,5 moli, 4,00 equiv.). Dopo di che è stata aggiunta goccia a goccia MsCl (1000 g, 8,73 moli, 2,00 equiv.) a -15°C. La soluzione risultante è stata agitata per una notte a 25°C. Questa reazione è stata condotta in parallelo per 3 volte e le miscele di reazione sono state combinate. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 2 L di acqua. La fase acquosa è stata estratta con etil acetato (1 × 9 L). Lo strato organico è stato separato e lavato con HCl 1 M (3 × 10 L), NaHCO₃ (aq saturo) (2 × 10 L), acqua (1 × 10 L) e salamoia (1 × 10 L). La miscela è stata seccata su sodio solfato anidro, filtrata e concentrata sotto vuoto. Ne risultava *tert*-butil N-[(1*r*,4*r*)-4-

[(metansolfonilossi)metil]cicloesil]carbammato (3300 g, 82%) come solido bianco. LC-MS: MS (ESI): massa calcolata per $C_{13}H_{25}NO_5S$, 307,15; m/z osservato 292,1, $[M-tBu+MeCN+H]^+$; 1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4,03 (d), $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,38 (s, 1H), 3,00 (s, 3H), 2,07-2,05 (m, 2H), 1,87-1,84 (m, 2H), 1,72-1,69 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,19-1,04 (m, 4H).

Passaggio C: *terz*-butil *N*-[(1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil]carbammato. In un pallone a 4 colli a fondo tondo da 10 L, è stato posto *terz*-butile *N*-[(1*r*,4*r*)-4-[(metansolfonilossi)metil]cicloesil]carbammato (1100 g, 3,58 moli, 1,00 equiv), DMSO (5500 mL) e NaCN (406 g, 8,29 moli, 2,30 equiv). La miscela risultante è stata agitata per 5 h a 90°C. Questa reazione è stata eseguita in parallelo 3 volte e le miscele di reazione sono state combinate. La reazione è stata poi spenta per aggiunta di 15 L di acqua/ghiaccio. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione. I solidi sono stati lavati con acqua (3 × 10 L). Questo risultava in *terz*-butil *N*-[(1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil]carbammato (2480 g, 97%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per $C_{13}H_{22}N_2O_2$, 238,17; m/z osservato 224 $[M-tBu+MeCN+H]^+$; 1H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4,39 (s, 1H), 3,38 (s, 1H), 2,26 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,08-2,04 (m, 2H), 1,92-1,88 (m, 2H), 1,67-1,61 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,26-1,06 (m, 4H).

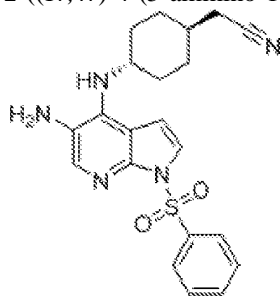
Passaggio D: 2-[(1*r*,4*r*)-4-amminocicloesil]acetoneitrile cloridrato. In un pallone a fondo tondo da 10 L è stato posto *terz*-butil *N*-[(1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil]carbammato (620 g, 2,60 moli, 1,00 equiv.), e 1,4-diossano (2 L). Dopo di che è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl in 1,4-diossano (5 L, 4 M) sotto agitazione a 10°C. La soluzione risultante è stata agitata per una notte a 25°C. Questa reazione è stata eseguita per 4 volte e le miscele di reazione sono state combinate. I solidi sono stati raccolti mediante filtrazione. I solidi sono stati lavati con 1,4-diossano (3 × 3 L), etil acetato (3 × 3 L) e esano (3 × 3 L). Ciò risultava in 2-[(1*r*,4*r*)-4-amminocicloesil]acetoneitrile cloridrato (1753 g, 96%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per $C_8H_{14}N_2$, 138,12; m/z osservata 139,25, $[M+H]^+$; 1H NMR: (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8,14 (s, 3H), 2,96-2,84 (m, 1H), 2,46 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 1,98 (d, $J = 11,1$ Hz, 2H), 1,79 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H), 1,64-1,49 (m, 1H), 1,42-1,29 (m, 2H), 1,18-1,04 (m, 2H).

Passaggio E: 2-((1*r*,4*r*)-4-(5-Nitro-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil]acetoneitrile.

In un pallone a fondo tondo da 1000 mL contenente 2-[(1*r*,4*r*)-4-amminocicloesil]acetonitrile cloridrato (29,10 g, 166,6 mmoli) è stato aggiunto DMA (400 mL). La sospensione risultante è stata trattata con 4-cloro-5-nitro-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridina (51,53 g, 152,6 mmoli), seguita da DIPEA (63,0 mL, 366 mmoli). La miscela di reazione è stata posta sotto N₂ e riscaldata a 80°C per 4 h. La miscela di reazione grezza è stata raffreddata a temperatura ambiente e versata lentamente in un pallone da 2 L agitato vigorosamente contenente 1,6 L di acqua. La sospensione risultante è stata agitata per 15 minuti a temperatura ambiente, poi filtrata ed essiccata per 16 ore in un forno sotto vuoto con riscaldamento a 70°C per fornire il composto del titolo (63,37 g, 95%) come solido giallo. MS (ESI): massa calcolata per C₂₁H₂₁N₅O₄S, 439,1; m/z osservato, 440,1 [M+H]⁺. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,10 (s, 1H), 8,99 (d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 8,23 - 8,15 (m, 2H), 7,66 - 7,59 (m, 2H), 7,56 - 7,49 (m, 2H), 6,67 (d, *J*= 4,2 Hz, 1H), 3,95 - 3,79 (m, 1H), 2,38 (d, *J*= 6,2 Hz, 2H), 2,32 - 2,21 (m, 2H), 2,08 - 1,98 (m, 2H), 1,88 - 1,76 (m, 1H), 1,60 - 1,32 (m, 4H).

Sintesi e caratterizzazione dell'intermedio 2

2-[(1*r*,4*r*)-4-(5-ammino-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil]acetonitrile

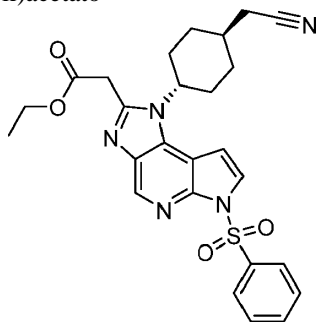


2-[(1*r*,4*r*)-4-(5-Nitro-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil]acetonitrile (intermedio 1, 58,60 g, 133,3 mmoli) è stato sciolto in THF/MeOH (1:1, 4800 mL). La miscela è stata fatta passare attraverso un reattore di idrogenazione a flusso continuo (10% Pd/C), come un Thales Nano H-Cube®, a 10 ml/min con idrogeno al 100 % (pressione atmosferica, 80°C), poi la soluzione è stata concentrata per fornire il prodotto come solido porpora. Il solido è stato triturato con EtOAc (400 mL) e poi triturato nuovamente con MeOH (200 mL) poi filtrato ed essiccato sotto vuoto per fornire il composto del titolo (50,2 g, resa 91,9%). MS (ESI): massa calcolata per C₂₁H₂₃N₅O₂S, 409,2; m/z osservato, 410,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,10 - 8,03 (m, 2H), 7,76 (s, 1H), 7,51 - 7,43 (m, 1H), 7,43 - 7,34 (m, 3H), 6,44 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 4,61 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H),

3,65 - 3,51 (m, 1H), 2,74 (s, 2H), 2,26 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,19 - 2,05 (m, 2H), 1,97 - 1,86 (m, 2H), 1,76 - 1,59 (m, 1H), 1,33 - 1,12 (m, 4H).

Sintesi e caratterizzazione dell'intermedio 3

Etile 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato

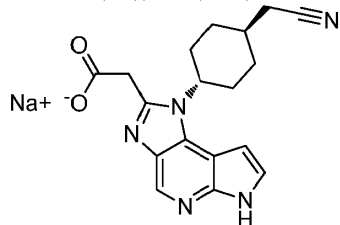


In un pallone a fondo tondo da 1 L contenente una barra di agitazione e 2-((1*r*,4*r*)-4-(5-ammino-1-(fenilsolfonil)-1H-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil)acetonitrile (intermedio 2, 58,31 g, 142,4 mmoli) è stato aggiunto etil 3-etossi-3-imminopropanoato (60,51 g, 309,3 mmoli), seguito da EtOH (600 mL, essiccato su setacci molecolari 3Å per 48 h). Un condensatore a refluxo è stato attaccato al pallone di reazione, la reazione è stata spurgata con N₂, ed è stata riscaldata a 90°C per 9 h. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e lasciata a riposo per 30 h dove il prodotto cristallizzava come aghi bruni. I solidi sono stati rotti con una spatola e la miscela di reazione è stata trasferita in un pallone da 2 L. Acqua (1,4 L) è stata aggiunta lentamente attraverso imbuto separatore con vigorosa agitazione. Dopo completamento dell'aggiunta dell'acqua, la sospensione è stata agitata per 30 minuti. Gli aghi bruni sono stati isolati mediante filtrazione e poi essiccati tirando aria attraverso il filtro per 1 h. Il prodotto è stato trasferito in una beuta da 500 mL e trattato con EtOAc (200 mL). Si è aggiunta una piccola quantità di cristalli di semina, cosa che ha indotto la formazione di un precipitato solido bianco. La sospensione è stata agitata per 30 minuti a temperatura ambiente, filtrata, risciacquata con EtOAc (25 mL) ed essiccata sotto vuoto per fornire il prodotto come solido bianco (48,65 g, resa 68%). MS (ESI): massa calcolata per C₂₆H₂₇N₅O₄S, 505,2; m/z osservata, 506,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,85 (s, 1H), 8,28 - 8,19 (m, 2H), 7,84 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,61 - 7,53 (m, 1H), 7,52 - 7,43 (m,

2H), 6,84 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 4,32 (s, 1H), 4,20 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,09 (s, 2H), 2,44 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,40 - 2,27 (m, 2H), 2,16 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H), 2,12 - 1,96 (m, 3H), 1,54 - 1,38 (m, 2H), 1,27 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

Sintesi e caratterizzazione dell'intermedio 4

Sodio 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato

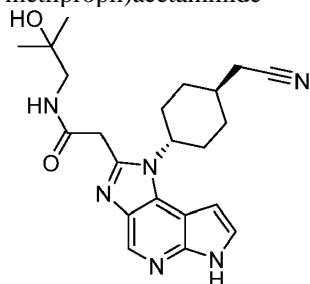


A una soluzione di etil 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (intermedio 3, 9,50 g, 18,8 mmoli) in MeOH (30 mL) e THF (30 mL) è stato aggiunto idrossido di sodio acquoso (56,4 mL, 56,4 mmoli, 1 M) ed è stato agitato a temperatura ambiente per 14 ore. Il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta a temperatura ambiente per fornire il composto del titolo (7 g) come un solido marrone, che è stato usato nello stadio successivo senza ulteriore purificazione. MS (ESI): massa calcolata per $C_{18}H_{18}N_5NaO_2$ 359,1, m/z osservato, 337,9 $[M+H-Na]^+$. 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8,52 - 8,47 (m, 1H), 7,85 - 7,81 (m, 2H), 7,46 - 7,41 (m, 4H), 6,85 - 6,81 (m, 1H), 4,60 - 4,46 (m, 1H), 3,96 (s, 2H), 2,59 - 2,49 (m, 4H), 2,19 - 2,05 (m, 6H), 1,56 - 1,43 (m, 2H) (una miscela 1:1 del composto del titolo e acido benzensolfonico).

Esempio 1 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piidin-2-il)-N-(2-idrossi-2-

metilpropil)acetammide



(Ex. 1)

Passaggio A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-

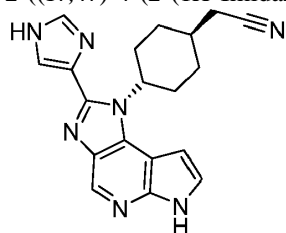
b]piridin-2-il)-N-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide. Per assicurare la sostanza di partenza secca, etil 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (intermedio 3) è stato riscaldato sotto vuoto a 50°C per 18 ore prima della reazione. In un pallone da 1 L, etil 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (intermedio 3, 52,585 g, 104,01 mmoli) è stato sospeso in DMA (50 mL). Si è aggiunto 1-ammino-2-metilpropan-2-olo (50 mL) e la reazione è stata riscaldata a 110°C per 45 minuti, poi a 125°C per 5 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita con EtOAc (800 mL). Lo strato organico è stato estratto tre volte con una soluzione di acqua/ salamoia in cui la soluzione era costituita da 1 L di acqua più 50 mL di salamoia. Gli strati acquosi sono stati nuovamente estratti con EtOAc (2 × 600 mL). Gli strati organici riuniti sono stati seccati su MgSO₄ anidro, concentrati ad essiccazione, e poi essiccati per 3 giorni sotto vuoto per fornire il composto del titolo (65,9 g, 98% di resa) come schiuma gialla. Il prodotto è stato portato al passaggio successivo senza ulteriore purificazione. MS (ESI): massa calcolata per C₂₈H₃₂N₆O₄S, 548,22; m/z osservata, 549,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,76 (s, 1H), 8,26 - 8,19 (m, 2H), 7,84 (d, J= 4,1 Hz, 1H), 7,60 - 7,53 (m, 1H), 7,50 - 7,44 (m, 2H), 6,84 (d, J= 4,2 Hz, 1H), 4,76 - 4,61 (m, 1H), 3,97 (s, 2H), 3,45 (s, 1H), 3,27 (d, J= 5,9 Hz, 2H), 2,41 (d, J= 6,5 Hz, 2H), 2,38 - 2,25 (m, 2H), 2,23 - 2,12 (m, 2H), 2,09 - 1,94 (m, 4H), 1,48 (qd, J= 13,6, 4,0 Hz, 2H), 1,21 (s, 6H).

Passaggio B: 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide. In un pallone da 1 L contenente una barra di agitazione è stato aggiunto 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-N-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide (65,90 g, 102,1 mmoli). 1,4-diossano (300 mL) è stato aggiunto, seguito da KOH acquoso (3 M, 150 mL). La reazione è stata riscaldata a 80°C per 2 h. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e il volume del solvente è stato ridotto a circa 200 mL su un evaporatore rotante. Il residuo è stato trattato con una soluzione di acqua/salamoia (100 mL/100 mL), poi estratto con MeOH al 10% in CH₂Cl₂ (2 × 1L). Gli strati organici sono stati combinati, essiccati su MgSO₄ anidro, e concentrati ad essiccazione a dare un solido giallo. Il solido è stato sospeso in CH₂Cl₂ (200 mL), agitato vigorosamente per 30 minuti, e poi

raccolto per filtrazione. Il solido è stato risciacquato con CH_2Cl_2 (100 mL), essiccato tirando aria attraverso il filtro, e poi ulteriormente essiccato sotto vuoto a temperatura ambiente per 16 h per fornire il composto del titolo (41,59 g, resa 89%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2$, 408,23; m/z osservata, 409,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11,85 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,21 - 8,10 (m, 1H), 7,49 - 7,43 (m, 1H), 6,74 - 6,65 (m, 1H), 4,53 - 4,42 (m, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,08 (d, $J= 6,0$ Hz, 2H), 2,58 (d, $J= 6,1$ Hz, 2H), 2,41 - 2,28 (m, 2H), 2,09 - 1,92 (m, 5H), 1,42 - 1,31 (m, 2H), 1,09 (s, 6H). La sintesi e la caratterizzazione dei composti attivi di ciascuna delle realizzazioni della presente invenzione sono fornite nella presente sotto forma di esempi. A causa della struttura cristallina di alcune delle realizzazioni di questa invenzione, si può perseguire uno *screening* dei polimorfismi per caratterizzare ulteriormente forme specifiche di qualsiasi di tali composti. Ciò è illustrato in modo non limitativo per il composto Ex. 1 dall'esempio avente titolo *screening* dei polimorfismi.

Sintesi e caratterizzazione dell'Esempio 2:

2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetonitrile



(Ex. 2)

Passaggio A: 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)-6-(fenilsolfonil)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetonitrile.

2-((1*r*,4*r*)-4-(5-Nitro-1-(fenilsolfonil)-1*H*-pirrolo[2,3-*b*]piridin-4-il)ammino)cicloesil)acetonitrile (intermedio 1, 23,3 g, 53,0 mmoli) è stato aggiunto in un pallone a fondo tondo da 1 L contenente una barra per agitazione magnetica seguita dall'aggiunta di DMSO (200 mL) e metanolo (200 mL). E' stata aggiunta 1*H*-imidazolo-4-carbaldeide (8,56 g, 89,1 mmoli) come solido, seguita dall'aggiunta di sodio idrosolfito (32,7 g, 188 mmoli) come soluzione in acqua (100 mL). Il recipiente di reazione è stato dotato di un condensatore a riflusso e riscaldato a 90°C in un blocco di riscaldamento per 15 h. La miscela di reazione è stata poi raffreddata a temperatura ambiente e aggiunta ad un pallone contenente acqua (2000 mL) con

agitazione, che ha portato alla formazione di un precipitato bianco. La miscela è stata agitata per 30 minuti e i solidi furono raccolti mediante filtrazione. I solidi sono stati essiccati tirando aria attraverso il filtro per 6 h e poi ulteriormente essiccati in un riscaldamento in forno sotto vuoto a 60 °C per 3 giorni per fornire il composto del titolo (22,7 g, resa 88%) come solido giallo. MS (ESI): massa calcolata per $C_{25}H_{23}N_7O_2S$, 485,16; m/z osservata, 486,1 $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8,74 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,20 - 8,11 (m, 2H), 8,04 - 7,96 (m, 2H), 7,76 - 7,68 (m, 1H), 7,68 - 7,60 (m, 2H), 7,19 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 5,56 (s, 1H), 2,58 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,38 - 2,24 (m, 2H), 2,07 (s, 1H), 1,98 (d, $J = 10,8$ Hz, 5H), 1,35 (q, $J = 12,3$ Hz, 2H).

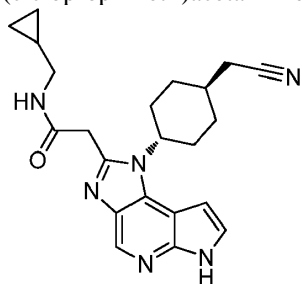
Passaggio B: 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazo-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile.

Il composto del titolo è stato preparato usando condizioni analoghe a quelle descritte nell'Esempio 1, Passaggio B usando 2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-imidazol-4-il)-6-(fenilsolfonil)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile (222 mg, 0,46 mmoli) invece di 2-(1-(((2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile (222 mg, 0,46 mmoli). 1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide e il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (0-15% 2*N* NH_3 -MeOH/EA) per fornire il composto del titolo (97 mg, resa del 69%). MS (ESI): massa calcolata per $C_{19}H_{19}N_7$, 345,17; m/z osservata, 346,0 $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 12,61 (s, 1H), 11,86 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,92 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,48 (t, $J = 3,0$ Hz, 1H), 6,76 (dd, $J = 3,5, 1,8$ Hz, 1H), 5,85 (s, 1H), 2,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,57 - 2,41 (m, 2H), 2,14 - 1,88 (m, 5H), 1,45 - 1,27 (m, 2H).

Esempio 3 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piidin-2-il)-*N*-

(ciclopropilmetil)acetammide



(Ex. 3)

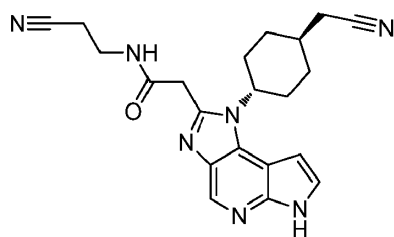
Passaggio A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-

b]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetammide. Una miscela di etil 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)acetato (intermedio 3, 555 mg, 1.06 mmoli) e ciclopropilmetilammina (1,87 mL, 21,1 mmoli) è stata riscaldata a 125°C per 1 ora in un reattore a microonde. Il residuo è stato trattato con acqua poi estratto con etil acetato. Gli strati organici sono stati combinati, seccati su sodio solfato, fatti passare attraverso un tappo di silice, e concentrati ad essiccazione usando un evaporatore rotante per fornire il composto del titolo (642 mg). MS (ESI): massa calcolata per C₂₈H₃₀N₆O₃S, 530,21; m/z osservata, 531,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8,64 (s, 1H), 8,19-8,11 (m, 2H), 7,95 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,66-7,57 (m, 1H), 7,57-7,48 (m, 2H), 7,11 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 4,53 (s, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,07 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,53 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,45-2,30 (m, 2H), 2,14-2,03 (m, 5H), 1,55 - 1,42 (m, 2H), 1,02-0,94 (m, 1H), 0,54-0,47 (m, 2H), 0,24-0,18 (m, 2H).

Passaggio B: 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetammide. A una miscela di 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-N-(ciclopropilmetil)acetammide (560 mg, 1,05 mmoli) in 1,4-diossano (4,2 mL) è stato aggiunto KOH 3N (2,81 mL). La miscela è stata riscaldata a 80°C per 1 h, poi purificata con HPLC basico: colonna Xbridge Prep OBD C₁₈ 50 mm x 100 mm, 5µm (eluente 0-100% aq NH₄OH/ACN (10 min)) per fornire il composto del titolo (187 mg, resa 46%). MS (ESI): massa calcolata per C₂₂H₂₆N₆O, 390,22; m/z osservata, 391,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8,57 (s, 1H), 7,50 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,86 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,11 (s, 2H), 3,13 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,67-2,52 (m, 4H), 2,20-2,03 (m, 5H), 1,58-1,44 (m, 2H), 1,12-0,97 (m, 1H), 0,60-0,48 (m, 2H), 0,31 - 0,22 (m, 2H).

Esempio 4 sintesi e caratterizzazione:

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)acetammide

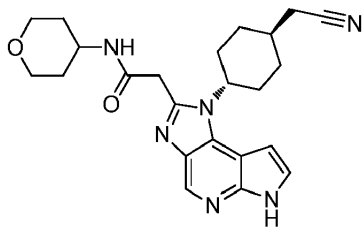


(Ex. 4)

Ad una soluzione di sodio 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)acetato (intermedio 4, 400 mg, 1,11 mmoli) e 3-amminopropanonitrile (320 mg, 2,24 mmoli) in DMF (5 mL) è stato aggiunto PyBOP (870 mg, 1,67 mmoli) e DIPEA (0,60 mL, 3,5 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 40 h. Dopo rimozione del DMF *sotto vuoto*, il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna usando dal 50 al 100% di etil acetato in eptano. Le frazioni raccolte sono state concentrate sotto vuoto a un piccolo volume e un solido bianco che era precipitato è stato filtrato, lavato con MeOH al 10% in CH₂Cl₂, ed essiccato per fornire il composto del titolo (75 mg, resa 17%). Il filtrato è stato concentrato ad essiccazione e purificato mediante HPLC in fase inversa usando una colonna Pursuit Varian XR₅ difenilica 100 mm × 30 mm (eluente 10 - 90% CH₃CN in acqua, 0,1% TFA) per fornire un olio trasparente. Questo materiale è stato disciolto in MeOH al 10% in CH₂Cl₂, è stato fatto passare attraverso tre colonne da 500 mg di SILICYCLE SPE-R66030B-03P Carbonate (cartuccia di estrazione in fase solida a captazione di acidi SiliaBond) per rimuovere il TFA ed eluito con MeOH al 10% in CH₂Cl₂ fornire una ulteriore frazione del composto del titolo (88 mg, 20% di resa). Le due frazioni sono state combinate per fornire il prodotto finale (163 mg, resa al 37%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₁H₂₃N₇O, 389,20; m/z osservata, 390,3 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8,53 (s, 1H), 7,48 (d, J= 3,0 Hz, 1H), 6,84 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 4,51 (s largo, 1H), 4,12 (s, 2H), 3,50 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 2,71 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 2,45 - 2,63 (m, 4H), 2,03 - 2,19 (m, 5H), 1,44 - 1,57 (m, 2H).

Sintesi e caratterizzazione di Esempio 5:

2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piidin-2-il)-N-(tetraidro-2H-piran-4-il)acetammide

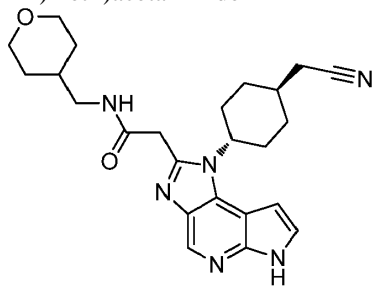


(Ex. 5)

Una miscela di etil 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)acetato (intermedio 3,309 mg, 0,61 mmoli) e 4-amminotetraidropirano (195 mg, 1,93 mmoli) in 1,4-diossano (0,5 mL) è stata riscaldata in un reattore a microonde a 180°C per 1 ora. La miscela di reazione è stata poi diluita con 1,4-diossano (1,5 mL), trattata con KOH 3N acquoso (2 mL), e riscaldata a 80°C per 1,5 ore. Il residuo è stato poi trattato con acqua (10 mL) ed estratto con CH₂Cl₂ (3 × 50 ml). Gli strati organici sono stati combinati, essiccati su MgSO₄ e concentrati *sotto vuoto*. Il materiale grezzo è stato purificato usando cromatografia su colonna flash (5-10% MeOH / CH₂Cl₂) per ottenere il composto del titolo (146 mg, 57% di resa). MS (ESI): massa calcolata per C₂₃H₂₈N₆O₂, 420,23; m/z osservata, 421,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,84 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,36 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,46 (t, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,73 - 6,67 (m, 1H), 4,54 - 4,41 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 3,86-3,81 (m, 2H), 3,81 - 3,74 (m, 1H), 3,40 - 3,34 (m, 2H), 2,60 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,41 - 2,29 (m, 2H), 2,10 - 2,01 (m, 1H), 2,00 - 1,93 (m, 4H), 1,77 - 1,70 (m, 2H), 1,49 - 1,33 (m, 4H).

Esempio 6 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide



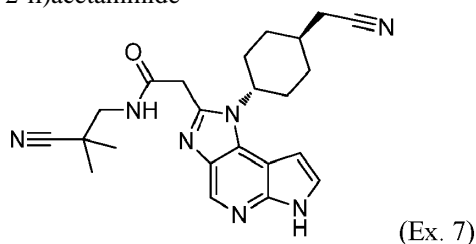
(Ex. 6)

Ad una fiala per microonde sono stati aggiunti etil 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (intermedio 3, 300 mg, 0,593 mmoli) e 4-amminometiltetraidropirano (683 mg, 5,93 mmoli). La soluzione risultante è stata agitata a 125°C per 1 h.

Successivamente sono stati aggiunti diossano (2,37 mL) e KOH (3 M in acqua, 1,58 mL, 4,75 mmoli) e la reazione è stata agitata nel forno a microonde a 80°C per 1 h. La reazione è stata purificata su HPLC basica usando una colonna Waters Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm, 5µm (eluente 0-100 % acqua (0,05% NH₄OH)/ACN (10 min)) per fornire il composto del titolo (97 mg, resa del 38%). MS (ESI): massa calcolata per C₂₄H₃₀N₆O₂, 434,24; m/z osservata, 435,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8,43 (s, 1H), 7,38 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 4,43 (s, 1H), 4,03 - 3,96 (m, 2H), 3,89 - 3,79 (m, 2H), 3,34 - 3,25 (m, 2H), 3,04 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,54 - 2,38 (m, 4H), 2,08 - 1,96 (m, 5H), 1,74 - 1,63 (m, 1H), 1,59 - 1,54 (m, 2H), 1,46 - 1,33 (m, 2H), 1,25 - 1,14 (m, 2H).

Esempio 7 sintesi e caratterizzazione:

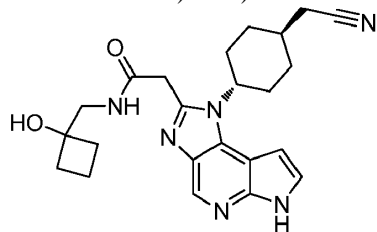
N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-(((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide



Una soluzione di sodio 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (Intermedio 4,300 mg, 0,835 mmoli), 3-ammino-2,2-dimetilpropanonitrile (22,0 mg, 0,835 mmoli), DIPEA (216 mg, 1,67 mmoli), e DMF (5 mL) è stata agitata a 0°C per 1 h. Poi PyBrOP (467 mg, 1,00 mmoli) è stato aggiunto e la miscela di reazione è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. La miscela è stata spenta con 10 mL di acqua e purificata mediante HPLC preparativa usando una colonna Waters Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm 5µm (eluente: 28% acqua (0,05% ammoniaca idrossido v/v)-ACN per fornire il composto del titolo (58 mg, resa 16%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₃H₂₇N₇O, 417,23; m/z osservata, 418,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,86 (s largo, 1H), 8,71 - 8,66 (m, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,48 - 7,45 (m, 1H), 6,73 - 6,69 (m, 1H), 4,53 - 4,42 (m, 1H), 4,10 (s, 2H), 3,33 - 3,31 (m, 1H), 2,57 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,41 - 2,27 (m, 2H), 2,05 - 1,93 (m, 5H), 1,45 - 1,26 (m, 9H).

Esempio 8 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide

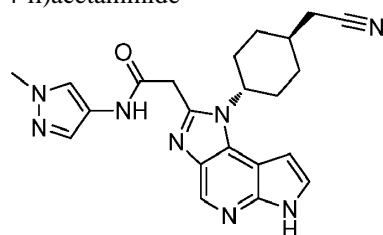


(Ex. 8)

Una soluzione di sodio 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (Intermedio 4,300 mg, 0,835 mmoli), 1-(amminometil)ciclobutanolo (84,4 mg, 0,835 mmoli), DIPEA (216 mg, 1,67 mmoli), e DMF (5 mL) è stata agitata a 0°C per 1 h. Successivamente, PyBrOP (467 mg, 1,00 mmoli) è stato aggiunto e agitato a temperatura ambiente per una notte, poi spento con 10 mL di acqua. La reazione è stata purificata mediante HPLC basica preparativa usando una colonna Kromasil 150 mm × 25 mm, 10 µm (eluente: acqua (0,05% ammoniaca idrossido v/v)-ACN da 9% a 39%, v/v) per fornire il composto del titolo (90 mg, resa 26%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₃H₂₈N₆O₂, 420,23; m/z osservata, 421,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,58 (s largo, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,94 - 7,85 (m, 1H), 7,46 - 7,40 (m, 1H), 6,75 - 6,70 (m, 1H), 4,89 (s largo, 1H), 4,57 - 4,47 (m, 1H), 4,04 (s, 2H), 3,27 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,55 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,45 - 2,31 (m, 2H), 2,10 - 1,88 (m, 9H), 1,71 - 1,60 (m, 1H), 1,54 - 1,35 (m, 3H).

Esempio 9 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetammide



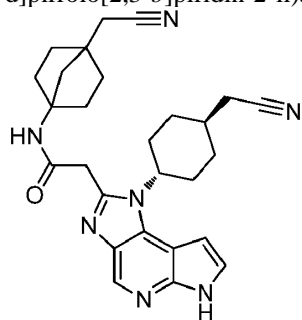
(Ex 9)

Ad una soluzione di sodio 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-

il)acetato (intermedio 4, 100 mg, 0,278 mmoli) e 1-metil-1*H*-pirazol-4-ammina (54,0 mg, 0,557 mmoli) in DMF (0,8 mL) sono stati aggiunti PyBrOP (217 mg, 0,417 mmoli) e DIPEA (0,144 mL, 0,835 mmoli) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La DMF è stata rimossa sotto pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (50-100% EtOAc/eptano, poi 10% MeOH / DCM) e successivamente mediante HPLC in fase inversa usando una colonna Varian Pursuit XR_s5 difenilica 100 mm × 30 mm (eluente 10 - 90% CH₃CN in acqua, 0,1% TFA) per fornire il prodotto come sale di TFA. Questo materiale è stato disciolto in 10% MeOH in CH₂Cl₂ e fatto passare attraverso una colonna da 500 mg di SILICYCLE SPE-R66030B-03P Carbonate (cartuccia di estrazione in fase solida a captazione di acidi SiliaBond) per rimuovere il TFA per fornire il composto del titolo (34 mg, resa del 29%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₂H₂₄N₈O, 416,21; m/z osservata, 417,3 [M+H]⁺. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 12,77 (s largo, 1H), 11,24 (s largo, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,89 (s largo, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,29 - 7,20 (m, 1H), 6,74 (s largo, 1H), 4,85 - 4,65 (m, 1H), 4,23 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,80 - 2,55 (m, 1H), 2,45 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,32 - 1,98 (m, 6H), 1,62 - 1,44 (m, 2H).

Esempio 10 sintesi e caratterizzazione:

N-(4-(cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide



(Ex. 10)

Passaggio A: Dimetil ciclopentano-1,3-dicarbossilato. Una soluzione di acido ciclopentano-1,3-dicarbossilico (70,0 g, 443 mmoli) e metanolo anidro (300 mL) è stata raffreddata a 0°C in un bagno di ghiaccio e acqua. Acido solforico concentrato (14 mL) è stato aggiunto goccia a goccia, mantenendo la temperatura a <15°C. Dopo l'aggiunta, la reazione è stata riscaldata a 90°C e agitata per tutta la notte. La reazione è stata raffreddata a

temperatura ambiente e concentrata ad essiccazione. Il residuo è stato trattato con MTBE (500 mL) e H₂O (100 mL). Lo strato acquoso è stato separato ed estratto con MTBE (2 × 100 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con bicarbonato di sodio saturo (2 × 100 mL), salamoia (100 mL), essiccati su MgSO₄ anidro, filtrati e concentrati ad essiccazione per fornire il composto del titolo (72,5 g, 88%) come un olio giallo chiaro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,65 (s, 6H), 2,84 - 2,72 (m, 2H), 2,26 - 2,17 (m, 1H), 2,11 - 2,02 (m, 1H), 1,96 - 1,88 (m, 4H).

Passaggio B: Dimetil biciclo[2.2.1]eptano-1,4-dicarbossilato. *n*-Butillitio (2,5 M in esano, 419,0 mL, 1048 mmoli) è stato aggiunto lentamente ad una soluzione di diisopropilammina (152 mL, 1090 mmoli) e THF anidro (1000 mL) a -78 °C (ghiaccio secco/acetone) in N₂. Successivamente, la reazione è stata agitata per 0,5 ore a 0°C prima del raffreddamento a -78°C. DMPU (404 mL, 3350 mmoli) è stata aggiunta tramite un imbuto per aggiunte. Poi una soluzione di dimetil ciclopentano-1,3-dicarbossilato (78,0 g, 419 mmoli) e THF anidro (300 mL) è stata aggiunta lentamente attraverso un imbuto per aggiunte. La reazione è stata riscaldata a 0°C e agitata per 30 minuti, poi raffreddata a -78°C e trattata con una soluzione di 1-bromo-2-cloroetano (59,0 mL, 712 mmoli) e THF anidro (200 mL). La reazione è stata lasciata riscaldare lentamente a temperatura ambiente ed è stata agitata per 12 ore a temperatura ambiente. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio acquoso saturo (400 mL). La reazione è stata diluita con etil acetato (500 mL), lo strato organico separato, e lo strato acquoso è stato inoltre estratto con etil acetato (2 × 500 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con salamoia (2 × 300 mL), essiccati su MgSO₄ anidro, filtrati e concentrati ad essiccazione. Il residuo è stato filtrato attraverso un tampone di gel di silice e lavato con etil acetato (2000 mL). Il filtrato è stato concentrato ad essiccazione e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (etere di petrolio/etil acetato, da 30:1 a 20:1, eluizione a gradiente) per fornire il composto del titolo (48,5 g, 54%) come solido bianco. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3,69 (s, 6H), 2,08 - 1,99 (m, 4H), 1,91 (s, 2H), 1,73 - 1,63 (m, 4H).

Passaggio C: Acido 4-(metossicarbonil)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilico. Una soluzione in metanolo (80 mL) di idrossido di sodio (5,145 g, 128,6 mmoli) è stata aggiunta lentamente ad una soluzione di dimetilbiciclo[2.2.1]eptano-1,4-dicarbossilato (27,3 g, 129 mmoli) e THF (700 mL) a 0°C e la miscela di

reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La reazione è stata concentrata a secco ed il residuo è stato triturato con MTBE (15 mL). Il precipitato viene raccolto per filtrazione, lavato con MTBE (5 mL), e disciolto in 100 mL di H₂O. La soluzione è stata acidificata a pH = 4 con HCl 2 M. Il precipitato è stato raccolto mediante filtrazione ed essiccato sotto vuoto ottenendo il composto del titolo (13,0 g, 51,0%) come solido bianco. Il filtrato è stato estratto con etil acetato (3 × 75 mL) e gli estratti organici combinati sono stati lavati con salamoia (50 mL), essiccati su MgSO₄ anidro, filtrati e concentrati ad essiccazione per fornire una seconda frazione del composto del titolo (8,0 g, 31%) sotto forma di un solido bianco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,21 (s largo, 1H), 3,59 (s, 3H), 1,94 - 1,86 (m, 4H), 1,74 (s, 2H), 1,61 - 1,54 (m, 4H).

Passaggio D: Metil 4-((benzilossi)carbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilato. Difenilfosforilazide (17,1 mL, 78,6 mmoli) è stata aggiunta a una soluzione di acido 4-(metossicarbonil)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilico (13,0 g, 65,6 mmoli), DIPEA (2,8 mL, 131 mmoli), e toluene anidro (200 mL) e la miscela di reazione è stata agitata a 110°C per 2 ore. La reazione è stata raffreddata a 50°C ed è stato aggiunto alcol benzilico (13,6 mL, 131 mmoli) e la miscela di reazione è stata agitata a 110°C per tutta la notte. La reazione è stata concentrata ad essiccazione, disciolta in MTBE (25 mL) e lavata con H₂O (150 mL). Lo strato organico è stato separato e lo strato acquoso è stato estratto con MTBE (2 × 100 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con soluzione salina (100 mL), essiccati su MgSO₄ anidro, filtrati e concentrati ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (etere di petrolio/etil acetato, da 10:1 a 5:1, eluizione a gradiente) per fornire un prodotto impuro (28,5 g) come olio giallo chiaro. Il prodotto è stato inoltre purificato mediante HPLC acida preparativa usando una colonna Phenomenex Synergi Max-RP 250 × 50 mm × 10 μm (eluente: da 38% a 68% (v/v) CH₃CN ed H₂O con TFA allo 0,1%). Le frazioni pure sono state combinate e i componenti volatili sono stati rimossi sotto vuoto. Il residuo è stato diluito con H₂O (80 mL), il pH della soluzione è stato regolato a pH = 8 con soluzione acquosa satura di NaHCO₃, e la soluzione risultante è stata estratta con CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con soluzione salina (75 mL), essiccati su MgSO₄ anidro, filtrati e concentrati ad essiccazione per fornire il composto del titolo (17,3 g, 85%) come un olio incolore. MS (ESI): massa calcolata per C₁₇H₂₁NO₄, 303,2; m/z osservata, 303,9 [M+H]⁺. ¹H NMR

(400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,56 (s largo, 1H), 7,37 - 7,30 (m, 5H), 4,97 (s, 2H), 3,58 (s, 3H), 1,90 - 1,80 (m, 6H), 1,65 - 1,59 (m, 4H).

Passaggio E: metil 4-((*terz*-butossicarbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilato. Una miscela di metil 4-((benzilossi)carbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilato (17 g, 56 mmoli), di-*terz*-butil dicarbonato (18,35 g, 84,06 mmoli), MeOH (200 mL) e Pd/C umido (4 g, 10% in peso, 50% H₂O) è stata aggiunta ad un pallone a fondo tondo da 500 ml con un palloncino di idrogeno (13 psi) ed è stata agitata a temperatura ambiente per 72 ore. Il catalizzatore è stato filtrato e il filtrato concentrato ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (etere di petrolio/etil acetato, da 20:1 a 1:1, eluizione a gradiente) per fornire il composto del titolo (12,0 g, 79,5%) come un solido bianco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,04 (s largo, 1H), 3,57 (s, 3H), 1,93 - 1,78 (m, 4H), 1,77 (s, 2H), 1,63 - 1,53 (m, 4H), 1,35 (s, 9H).

Passaggio F: Acido 4-(((*terz*-butossicarbonil)-ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilico. Ad una soluzione di metile 4-((*terz*-butossicarbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilato (5,0 g, 19 mmoli), THF (40 mL) e MeOH (20 mL) è stato aggiunto idrossido di sodio acquoso (1,0 M, 46,4 mL, 46,4 mmoli) a temperatura ambiente e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione è stata concentrata ad essiccazione e il residuo è stato diluito con H₂O (20 mL), acidificato a pH = 4-5 con HCl 2 M per fornire un precipitato. Il precipitato è stato sciolto in 150 mL di etil acetato, lavato con salamoia (45 mL), essiccato su Na₂SO₄, filtrato e concentrato ad essiccazione per fornire il composto del titolo (4,74 g, 100% di resa) come solido bianco, che è stato usato direttamente nel passaggio successivo. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12,06 (s largo, 1H), 7,00 (s largo, 1H), 1,87 - 1,73 (m, 6H), 1,58 - 1,50 (m, 4H), 1,35 (s, 9H).

Passaggio G: *terz*-Butil (4-(idrossimetil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)carbammato. Una soluzione del complesso borano-tetraidrofurano (1,0 M, 37,1 mL, 37,1 mmoli) è stata aggiunta lentamente ad una soluzione di acido 4-((*terz*-butossicarbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptano-1-carbossilico (4,74 g, 18,6 mmoli) e THF anidro (50 mL) a 0°C in atmosfera di azoto. Dopo completamento dell'aggiunta, la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. Alla miscela è stata aggiunta lentamente acqua (30 mL) ed è stata agitata per altri 30 minuti. La reazione è stata concentrata ad essiccazione e il residuo è stato diluito con etil acetato (50 mL), lavato con H₂O

(15 mL) e salamoia (10 mL), seccato su Na₂SO₄ anidro, filtrato e concentrato ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (etere di petrolio/etil acetato, 2:1) per fornire il composto del titolo (4,0 g, resa 89%) come solido bianco. TLC (etere di petrolio/etil acetato, 2:1), R_f = 0,5. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 6,88 (s largo, 1H), 4,38 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,36 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H), 1,73 (s largo, 2H), 1,64 - 1,49 (m, 4H), 1,42 (s, 2H), 1,39 - 1,33 (m, 9H), 1,25 - 1,16 (m, 2H).

Passaggio H: (4-((*terz*-Butossicarbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)metilmetansolfonato. Piridina (2,7 mL, 33 mmoli) è stata aggiunta ad una soluzione di *terz*-butil (4-(idrossimetil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)carbammato (2,0 g, 8,3 mmoli) e CH₂Cl₂ anidro (30 mL). La reazione è stata raffreddata a 0°C ed è stato aggiunto cloruro di metanosolfonile (2,0 mL, 25,0 mmoli) e la miscela è stata agitata per 3 ore a temperatura ambiente. La reazione è stata diluita con CH₂Cl₂ (50 mL) e acqua (30 mL). Lo strato organico è stato separato, lavato con soluzione salina (15 mL), essiccato su MgSO₄ anidro, filtrato e concentrato ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash (etere di petrolio/etil acetato, da 5:1 a 1:1, eluizione a gradiente) per fornire il composto del titolo (2,58 g, 97%) come solido bianco. TLC (etere di petrolio/etil acetato, 1:1), R_f = 0,85. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 4,73 (s largo, 1H), 4,21 (s, 2H), 2,98 (s, 3H), 1,93 - 1,90 (m, 2H), 1,78 - 1,62 (m, 6H), 1,53 - 1,34 (m, 11H).

Passaggio I: *terz*-butil (4-(cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)carbammato. A una soluzione di (4-((*terz*-butossicarbonil)ammino)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)metilmetansolfonato (2,58 g, 8,07 mmoli) e DMSO (25 mL) è stato aggiunto cianuro di sodio (1,20 g, 24,5 mmoli). La reazione è stata riscaldata a 100°C e agitata per 24 ore. La reazione è stata diluita con 50 mL di acqua ed estratta con etil acetato (3 × 40 mL). Gli estratti organici riuniti sono stati lavati con salamoia (20 mL), seccati su Na₂SO₄, filtrati e concentrati ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna (etere di petrolio/etil acetato, 5:1) per fornire il composto del titolo (1,8 g, resa 89%) come solido bianco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,00 (s largo, 1H), 2,67 (s, 2H), 1,82 (s largo, 2H), 1,69 - 1,52 (m, 6H), 1,47 - 1,40 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

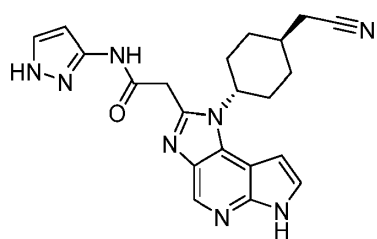
Passaggio J: 2-(4-Amminobiciclo[2.2.1]eptan-1-il)acetonitrile cloridrato. Ad una sospensione di *terz*-butile (4-(cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)carbammato (850 mg, 3,40 mmoli) e etil acetato (2 mL) a 0°C è stata

aggiunta una soluzione di HCl in etil acetato (4,0 M, 10 mL, 40 mmoli). Dopo agitazione a temperatura ambiente per 2 ore, la miscela è stata concentrata sotto pressione ridotta ad essiccazione. Il residuo è stato tritato con MTBE (5 mL) e la sospensione è stata isolata per filtrazione. Il pannello di filtrazione è stato lavato con MTBE (1 mL) ed essiccato a pressione ridotta per fornire il composto del titolo (450 mg, 71%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₉H₁₄N₂ 150,12 m/z osservata 151,1 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,59 (s. largo, 3H), 2,78 (s, 2H), 1,90 - 1,77 (m, 2H), 1,74 - 1,62 (m, 4H), 1,60 (s, 2H), 1,56 - 1,46 (m, 2H).

Passaggio K: *N*-(4-(cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide. Ad una soluzione di sodio 2-(1-((*Ir,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (Intermedio 4, 300 mg, 0,835 mmoli), 2-(4-amminobiciclo[2.2.1]eptan-1-il)acetonitrile cloridrato (138 mg, 0,918 mmoli), e DIPEA (0,291 mL, 1,67 mmoli) in DMF anidra (6 mL) è stato aggiunto PyBrOP (428 mg, 0,918 mmoli) a 0°C. La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 12 h. La miscela è stata spenta con 10 mL di acqua ed estratta con EtOAc (3 × 20 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con soluzione salina, seccate su Na₂SO₄, filtrate e concentrate ad essiccazione. Il residuo è stato purificato mediante HPLC preparativa (usando una colonna Xtimate C₁₈ 150 × 25 mm × 5 μm (eluente: da 23% a 33% (v/v) CH₃CN e H₂O con 10 mM NH₄CO₃) e mediante TLC preparativa (diclorometano: metanolo = 15:1) fornire il composto del titolo (36,6 mg, resa del 9%) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₇H₃₁N₇O, 469,3; m/z osservata, 470,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400MHz, CD₃OD): δ 8,53 (s, 1H), 7,48 (d, *J*= 4,0 Hz, 1H), 6,84 (d, *J*= 4,0 Hz, 1H), 4,47 (s largo, 1H), 4,07 - 4,02 (m, 2H), 2,63 (s, 2H), 2,61 - 2,50 (m, 4H), 2,18 - 1,98 (m, 7H), 1,94 - 1,84 (m, 2H), 1,82 (s, 2H), 1,79 - 1,68 (m, 2H), 1,62 - 1,43 (m, 4H).

Esempio 11 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((*Ir,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide



(Ex. 11)

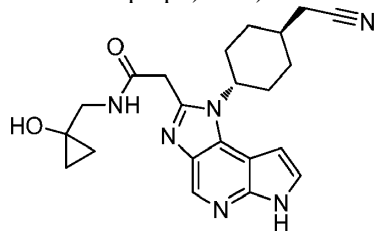
Passaggio A: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-b]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide. Il composto del titolo (383 mg, 70%) è stato preparato in un modo analogo a quello descritto nell'Esempio 1, Passaggio A usando 1*H*-pirazol-3-ammina (465 mg, 5,48 mmoli) invece di 1-ammino-2-metilpropan-2-olo. MS (ESI): massa calcolata per C₂₇H₂₆N₈O₃S, 542,2; *m/z* osservata, 543,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,36 (s, 1H), 11,36 (s, 1H), 10,81 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 8,14 - 8,10 (m, 2H), 7,96 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 7,72 - 7,68 (m, 1H), 7,63 - 7,60 (m, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,13 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 6,44 - 6,41 (m, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,57 (s, 1H), 4,44 (s, 2H), 4,24 (s, 2H), 2,56 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,23 - 2,13 (m, 2H), 2,02 - 1,95 (m, 1H), 1,41 - 1,32 (m, 2H).

Passaggio B: 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide. Il composto del titolo è stato preparato in una maniera analoga all'Esempio 1, Passaggio B usando 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide (270 mg, 0,500 mmoli) al posto di 2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-6-(fenilsolfonil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide e purificato tramite HPLC basico usando un sistema Xbridge Prep OBD C₁₈ 150 mm × 30 mm, 5μm, eluente 5% ACN/NH₄OH (aq) (10 minuti) per fornire il composto del titolo (15 mg, 7%). MS (ESI): massa calcolata per C₂₁H₂₂N₈O, 402,5; *m/z* osservata, 403,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,35 (s, 1H), 11,85 (s, 1H), 10,84 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,58 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,46 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 6,47 - 6,39 (m, 1H), 4,64 - 4,46 (m, 1H), 4,21 (s, 2H), 2,57 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,45 - 2,26 (m, 2H), 2,08 - 1,88 (m, 5H), 1,39 (q, *J* = 11,7 Hz, 2H).

Esempio 12 sintesi e caratterizzazione:

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-

idrossiciclopropil)metil)acetammide



(Ex. 12)

Una soluzione di sodio 2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetato (Intermedio 4, 300 mg, 0,835 mmoli), 1-(amminometil)ciclopropanolo (72,7 mg, 0,835 mmoli), DIPEA (216 mg, 1,67 mmoli), e DMF (5 mL) è stata agitata a 0°C per 1 h. Poi PyBrOP (467 mg, 1,00 mmoli) è stato aggiunto e agitato a temperatura ambiente per la notte. La miscela è stata spenta con 10 mL di acqua ed è stata purificata mediante HPLC basica preparativa usando una colonna Kromasil 150 mm × 25 mm, 10 μm (eluente: acqua (0,05% ammonio idrossido v/v)-ACN da 5% a 35%, v/v) per fornire il composto del titolo (84 mg, 25% di resa) come solido bianco. MS (ESI): massa calcolata per C₂₂H₂₆N₆O₂, 406,21; m/z osservata, 407,2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 11,53 (s largo, 1H), 8,50 (s, 1H), 8,03 - 7,93 (m, 1H), 7,44 - 7,40 (m, 1H), 6,74 - 6,71 (m, 1H), 5,04 (s, 1H), 4,58 - 4,49 (m, 1H), 4,02 (s, 2H), 3,29 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,55 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,45 - 2,31 (m, 2H), 2,10 - 1,97 (m, 5H), 1,50 - 1,37 (m, 2H), 0,62 - 0,55 (m, 2H), 0,55 - 0,48 (m, 2H).

Esempio di screening di polimorfi

Alcune realizzazioni di composti secondo questa invenzione come basi libere presentano configurazioni cristalline multiple che hanno un comportamento complesso allo stato solido, alcune delle quali a loro volta possono presentare caratteristiche distintive tra loro dovute a differenti quantità di solvente incorporato. Alcune realizzazioni di composti secondo questa invenzione sono in forma di pseudopolimorfo, che sono realizzazioni dello stesso composto che presentano differenze di composizione nel reticolo cristallino dovute a quantità differenti di solvente nel reticolo cristallino stesso. In aggiunta, solvatazione di canali può anche essere presente in alcune realizzazioni cristalline di composti secondo questa invenzione, in cui il solvente è incorporato all'interno di canali o vuoti che sono presenti nel reticolo cristallino. Per esempio, le varie configurazioni cristalline riportate in Tabella 2 sono state osservate per il composto Ex. 1. Per queste caratteristiche, sono stati

spesso osservati solvati non stechiometrici, come illustrato in Tabella 2. Inoltre, la presenza di tali canali o vuoti nella struttura cristallina di alcune realizzazioni secondo questa invenzione consente la presenza di acqua e/o molecole di solvente che sono mantenute all'interno della struttura cristallina con gradi variabili di forza di legame. Di conseguenza, variazioni nelle specifiche condizioni ambientali possono facilmente portare a qualche perdita o guadagno di molecole di acqua e/o molecole di solvente in alcune realizzazioni secondo questa invenzione. Si intende che "solvatazione" (terza colonna nella Tabella 2) per ciascuna delle realizzazioni elencate nella Tabella 2 è la solvatazione della formula, e che la determinazione effettiva dello stesso come un numero di stechiometria (quarta colonna nella Tabella 2) può leggermente variare dalla solvatazione di formula in dipendenza dalle condizioni ambientali effettive quando è determinata sperimentalmente. Per esempio, se circa la metà delle molecole di acqua in una realizzazione può essere presente come legata a idrogeno al composto attivo nel reticolo cristallino, mentre circa l'altra metà delle molecole di acqua può essere in canali o vuoti nel reticolo cristallino, allora variazioni nelle condizioni ambientali possono alterare la quantità di tali molecole di acqua contenute in modo lasco nei vuoti o canali, e poi portare a una leggera differenza tra la solvatazione di formula che è assegnata secondo, per esempio, diffrazione a cristallo singolo, e la stechiometria che è determinata, per esempio, mediante analisi termogravimetrica accoppiata con spettroscopia di massa.

Tabella 2. Realizzazioni di forme cristalline del composto Ex. 1

Realizzazione	Solvente di cristallizzazione	Solvatazione	Stechiometria
1s	-	monoidrato	0,8 H ₂ O
1a	Acqua	monoidrato	1,3 H ₂ O
1b	Toluene	solvato con toluene	0,4 toluene
1c	Acetato di etile/1,4-diossano	monoidrato	1,1 H ₂ O
1d	acetonitrile/cloroformio	1,7 idrato	1,7 H ₂ O
1e	Acetato di etile/1,4-diossano	monoidrato	1 H ₂ O

Realizzazione	Solvente di cristallizzazione	Solvatazione	Stechiometria
1f	p-xilene	solvato di p-xilene	0,3 p-xilene
1f	Cumene	Solvato di cumene	0,3 Cumene
1g	Anisolo	solvato di anisolo	0,3 anisolo
1h	p-xilene	solvato di p-xilene	0,2 p-xilene
2	1,4-diossano	Solvato di 1,4-diossano	1,2 1,4-diossano
3b	Cicloesano	Solvato di cicloesano	0,3 Cicloesano
3c	1,4-diossano	Solvato di 1,4-diossano	0,5 1,4-diossano
3d	THF	Solvato di THF	0,4 THF
3e	Isobutanolo	solvato di isobutanolo	0,7 isobutanolo
1b+4	Acqua/metanolo	Solvato idrato/metanolo misto	-
5	Cloroformio	Solvato di cloroformio	0,5 cloroformio
6	acetonitrile	Anidro	0,2 acetonitrile
1s+7	Eptano	solvato di eptano	0,1 eptano
7	-	Non solvato	-
8	-	Non solvato	-
9	-	Non solvato	-
10		Diidrato	1,8 H ₂ O

Il composto che è stato ottenuto come descritto nell'Esempio 1 è stato inoltre cristallizzato preparando una

sospensione in DCM (1:3, per esempio 10 g di composto in 30 mL DCM) che è stata agitata a 40°C per 4 ore, e ancora agitata per 14 ore a 25°C, poi l'eptano è stato aggiunto lentamente (1:2, per esempio 20 mL di eptano nel composto/impasto di DCM/soluzione) a 25°C, agitato a 40°C per 4 ore, raffreddato a 25°C e agitato per altre 14 ore a 25°C. Successiva filtrazione porta al composto Ex. 1 sotto forma di un solido biancastro, che è stato identificato come un monoidrato, una realizzazione di 1s.

Le realizzazioni da 1 a 10 nella tabella 2 e figura 2 sono cristalline. Le realizzazioni 1s e da 1a a 1h sono isostrutturali. La realizzazione 1s cristallizza in un gruppo spaziale triclino centro-simmetrico P-1. Il termine "realizzazione 1" si riferisce complessivamente alle realizzazioni isostrutturali 1s e da 1a a 1h. Una qualsiasi di tali realizzazioni 1s e da 1a a 1h è talvolta chiamata elemento isostrutturale della realizzazione 1 o semplicemente come elemento della realizzazione 1. Le realizzazioni 3b, 3c, 3d e 3e sono isostrutturali e cristallizzano nel sistema monoclinico, gruppo spaziale C2/c. Il termine "realizzazione 3" si riferisce complessivamente alle realizzazioni isostrutturali 3b, 3c, 3d e 3e. Una qualsiasi di tali realizzazioni 3b, 3c, 3d e 3e è talvolta chiamata elemento isostrutturale della realizzazione 3 o semplicemente come elemento della realizzazione 3. Le realizzazioni isostrutturali sono tali da possedere proprietà di struttura cristallina simili (stesse simmetrie e simili parametri di cella unitaria e impaccamento di cristallo) pur avendo differenti composizioni chimiche (cioè, differenti molecole di solvente e/o acqua incorporate nel reticolo cristallino). I parametri delle celle unitarie nelle realizzazioni isostrutturali possono leggermente differire a causa della differente composizione (solvente o acqua incorporati nella struttura cristallina). Realizzazioni riferite nella Tabella 2 sono state preparate e/o inter-convertite come mostrato schematicamente nella Figura 2 e come descritto più dettagliatamente nelle seguenti tecniche di *screening*.

Lo *screening* includeva protocolli di cristallizzazione come equilibratura in solvente in solventi puri, cristallizzazione per evaporazione, cristallizzazione per raffreddamento con filtrazione a caldo, cristallizzazione istantanea con anti-solvente, e cristallizzazione mediante cicli termici. I solidi sono stati analizzati mediante HT-XRPD. Quando applicabile, le acque madri sono state evaporate completamente e i solidi rimanenti sono stati anche analizzati tramite HT-XRPD. La forma solida predominante che è stata identificata è la realizzazione del

materiale di partenza 1s come monoidrato.

Equilibratura in solvente a 25°C e 50°C

Esperimenti di sospensione a lungo termine furono eseguiti sospendendo la realizzazione del composto 1s in venti solventi puri e agitati a temperatura ambiente per due settimane e a 50°C per una settimana. Al completamento del tempo di equilibrio, i solidi residui sono stati separati dalle acque madri. I solidi sono stati essiccati in condizioni ambiente e essiccati sotto vuoto (5 mBar) prima di essere analizzati mediante HT-XRPD. Successivamente, i solidi sono stati esposti a condizioni di invecchiamento accelerato (40°C / 70% di umidità relativa) per due giorni e nuovamente analizzati tramite HT-XRPD.

Dalla maggior parte dei solventi di cristallizzazione, è stato ottenuto il materiale di partenza come realizzazione 1s. Da diversi solventi di cristallizzazione, sono stati trovati modelli HT-XRPD simili a quelli della realizzazione iniziale 1s. Nella maggior parte di questi modelli di diffrazione, sono stati identificati spostamenti dei picchi e/o picchi addizionali. Ciascuno di questi modelli corrispondeva ad una realizzazione che è stata etichettata come una tra 1a e 1h, e in base alle analogie nei modelli di diffrazione HT-XRPD per tali realizzazioni, essi sono presentati come realizzazioni che sono elementi isostrutturali della realizzazione 1. Tutti gli elementi isostrutturali della realizzazione 1 convertivano alla realizzazione 1a dopo esposizione a 40°C e 75% RH per due giorni.

La realizzazione 1s veniva convertita nella realizzazione idratata 10 quando veniva esposta a 100% RH a 25°C. Tuttavia, la realizzazione 10 non era fisicamente stabile a condizioni ambientali. Mentre la realizzazione 1s cristallizzava nel sistema triclinico, gruppo spaziale P-1, si è osservato che la realizzazione 10 cristallizzava nel sistema monoclinico, gruppo spaziale C2/c. La realizzazione 10 aveva limitata stabilità fisica in condizioni ambientali e si convertiva in un'altra realizzazione come 1s o 1a. Questo comportamento è attribuibile ad un legame disugualmente forte di tutte le molecole di idratazione/solvatazione. In questo caso, la realizzazione 10 avrebbe una seconda molecola d'acqua meno fortemente legata che andrebbe persa in condizioni ambientali. Più precisamente, la stabilità fisica della realizzazione 1s è stata indagata nelle camere climatiche esponendo un campione di 20 mg di tale realizzazione a 40°C e 70% di umidità relativa per quattro giorni, e un altro campione

di 20 mg della stessa realizzazione è stato esposto anche per quattro giorni a 25°C e 100% di umidità relativa. Dopo quattro giorni, i vari campioni solidi sono stati analizzati con HR-XRPD, sono stati determinati i parametri delle celle cristalline e i diffrattogrammi sono stati indicizzati. I diffrattogrammi sono mostrati in figura 6. Dal basso verso l'alto, il primo diffrattogramma di figura 6 corrisponde alla realizzazione 1s come materiale di partenza, e la seconda corrisponde alla stessa forma dopo una esposizione di 4 giorni a 40°C e 70% di umidità relativa, nota come "1s 70 RH" nella stessa figura. Questa analisi ha rivelato che la realizzazione iniziale 1s era stata recuperata sebbene con una piccola quantità di una seconda forma cristallina che forse era un'altra realizzazione idratata con un più alto contenuto di acqua. L'indicizzazione per tale forma non era possibile a causa della piccola quantità in cui era presente. Il terzo diffrattogramma corrisponde alla realizzazione 1s dopo 4 giorni di esposizione a 25°C e 100% di umidità relativa, nota come "10" nella stessa figura. Queste condizioni portano alla conversione della realizzazione 1s nella realizzazione 10, con una piccola contaminazione della realizzazione iniziale 1s e solvatazione come caratterizzata nella Tabella 2. Dopo disidratazione, entrambe le realizzazioni 1s e 10 ricristallizzavano alla forma anidra con un punto di fusione di 148°C.

Equilibratura con solvente a temperatura ambiente ha dato la realizzazione 1b da toluene come solvente di cristallizzazione, e la realizzazione 1f da p-xilene come solvente di cristallizzazione.

Tre realizzazioni solide addizionali sono state identificate e designate come realizzazioni 2, 3 e 7. La realizzazione 2 è stata identificata dall'esperimento di equilibratura in solvente eseguito a temperatura ambiente in 1,4-diossano mentre la realizzazione 7 è stata trovata come una miscela con la realizzazione 1s nell'esperimento di equilibratura in solvente singolo a 50°C da eptano. Sono stati identificate diversi diffrattogrammi simili ma non identici che sono stati raggruppati come realizzazioni 3b, 3c, 3d e 3e che sono membri isostrutturali della realizzazione 3. Gli elementi microstrutturali della realizzazione 3 sono stati trovati mescolati con gli elementi della realizzazione 1. Le miscele contenenti elementi della realizzazione 3 si trasformavano in alcuni casi nella realizzazione 1a o in miscele delle realizzazioni 1a e 3e. La realizzazione 7 sembrava essere fisicamente stabile, ma la realizzazione 2 si convertiva nella realizzazione 3e dopo esposizione ad AAC per due giorni.

Cristallizzazione per evaporazione.

Le acque madri recuperate dagli esperimenti di equilibratura in solvente eseguiti a RT sono state usate per esperimenti di cristallizzazione ad evaporazione lenta. Le acque madri sono state filtrate per rimuovere qualsiasi particolato e lasciate evaporare lentamente in condizioni ambientali. I solidi ottenuti sono stati analizzati tramite HT-XRPD e nuovamente dopo esposizione ad AAC per due giorni.

A causa della scarsa solubilità del composto Ex. 1 in alcuni dei solventi, non sono stati recuperati solidi quando tali solventi sono stati usati. Negli esperimenti in cui i solidi erano precipitati, un residuo amorfo o elementi isostrutturali delle realizzazioni 1 o 3 sono stati recuperati. Durante lo studio di stabilità, i diversi membri della realizzazione 1 convertivano nella realizzazione 1a mentre il campione della realizzazione 3 sembrava essere fisicamente stabile. Il solido amorfo in alcuni casi è rimasto amorfo dopo lo studio di stabilità, diventando deliquescente o mostrando alcuni segni di cristallinità.

Cristallizzazione per raffreddamento

Le acque madri degli esperimenti di equilibratura in solventi eseguiti a 50°C sono state filtrate a 50°C per rimuovere qualsiasi materiale particellare. Le sospensioni a 50°C sono state filtrate usando filtri di PTFE da 0,2 µm, e le soluzioni sono state poste a 5°C e invecchiate per 72 ore. Quando i solidi erano precipitati durante l'invecchiamento, questi solidi venivano separati dal liquido, essiccati in condizioni ambiente e sotto vuoto, e analizzati mediante HT-XRPD. Le acque madri rimanenti sono state lasciate evaporare lentamente e i solidi rimanenti sono stati analizzati tramite HT-XRPD. I campioni in cui non si verificava precipitazione sono stati posti sotto vuoto e i solidi essiccati sono stati analizzati mediante HT-XRPD. Tutti i solidi sono stati poi esposti ad AAC (2 giorni a 40°C/70% RH) e rianalizzati mediante HT-XRPD.

I solidi non precipitavano per raffreddamento in alcune delle soluzioni, nel qual caso le soluzioni furono evaporate in condizioni ambientali. A causa della bassa solubilità del composto Ex. 1 in alcuni solventi, non sono stati ottenuti solidi da alcune soluzioni.

Da quattro solventi (2-propanolo, 2-butanone, acetonitrile e metanolo) si verificava precipitazione. La realizzazione 6 è stata identificata dopo evaporazione di un singolo esperimento di cristallizzazione da

raffreddamento su scala mL in 800 μ L di acetonitrile, concentrazione di 25 mg/mL. La realizzazione 6 sembrava essere una forma solida stabile dopo 2 giorni AAC, e sembrava una realizzazione non solvatata.

Cristallizzazione per raffreddamento/evaporazione su scala μ L

Gli esperimenti di cristallizzazione per raffreddamento/evaporazione su scala μ L sono stati eseguiti in una piastra da 96 pozzetti, usando 12 solventi allo stato puro e 12 miscele di solventi e applicando quattro profili di temperatura. In ciascun pozzetto, approssimativamente 4 mg della realizzazione 1s sono stati dosati a solido. Successivamente, i solventi di cristallizzazione (80 μ L) e le miscele di solventi sono stati aggiunti per raggiungere una concentrazione di 50 mg/mL, e la piastra, con ciascun pozzetto singolarmente sigillato, per essere successivamente sottoposta ad uno dei quattro profili di temperatura. Al completamento del profilo di temperatura i solventi sono stati lasciati evaporare a bassa pressione ambiente (24 ore) e i solidi rimanenti sono stati analizzati tramite HT-XRPD prima e dopo esposizione ad AAC per 2 giorni (40°C/70% RH).

Elementi delle realizzazioni 1 e 3 sono stati osservati dalla maggior parte dei sistemi solventi e dei profili di temperatura. Tuttavia, è stata osservata una certa tendenza della forma solida rispetto al profilo di temperatura. La realizzazione 1b è stata principalmente identificata dai profili di temperatura corti (3 ore di invecchiamento). Tuttavia, gli stessi sistemi solventi con lunghi tempi di invecchiamento hanno portato all'identificazione della realizzazione 1f, membri della realizzazione 3 o miscele di membri delle realizzazioni 1 e 3. La realizzazione 3c è stata ottenuta con 1,4-diossano come solvente di cristallizzazione e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, mantenuta per 60 minuti, seguita da raffreddamento a un regime di 1°C/h a una temperatura finale di 20°C, mantenuta per 48 ore; la realizzazione 3d è stata ottenuta con tetraidrofurano come solvente di cristallizzazione e lo stesso profilo di temperatura della realizzazione 3c.

La realizzazione 4 è stata identificata in esperimenti effettuati in metanolo/acqua (50/50, v/v), THF e DCM/IPA (50/50, v/v) quando sono state applicate condizioni di invecchiamento breve. La realizzazione 4 è stata ottenuta trattando la realizzazione 1s con una miscela (50/50) di acqua e metanolo e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, mantenuta per 60 minuti, seguita da raffreddamento a una velocità di 20°C/h a una temperatura finale di 5°C, mantenuta per 3 ore, che ha dato la realizzazione 4 assieme alla realizzazione 1b. La

realizzazione 4 insieme alla realizzazione 1b è stata anche ottenuta trattando 1s con una miscela (50/50) di acqua e metanolo e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, mantenuta per 60 minuti, seguita da raffreddamento a una velocità di 20°C/h a una temperatura finale di 20°C, mantenuta per 3 h. La realizzazione 4 non sembrava essere fisicamente stabile in condizioni ambientali. Esperimenti di cristallizzazione per raffreddamento hanno dato la realizzazione 1c da etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v) come solvente di cristallizzazione e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, tenuto per 60 minuti, seguito da raffreddamento a un regime di 1°C/h a una temperatura finale di 5°C, tenuta per 48 h; la realizzazione 1d da acetonitrile/cloroformio (50/50, v/v) come solvente di cristallizzazione e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, tenuto per 60 minuti, seguito da raffreddamento a un regime di 1°C/h a una temperatura finale di 5°C, mantenuta per 48 h; e la realizzazione 1e da etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v) come solvente di cristallizzazione e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, tenuto per 60 minuti, seguito da raffreddamento a un regime di 1°C/h a una temperatura finale di 20°C, tenuto per 48 h.

La realizzazione 5 è stata identificata in esperimenti effettuati in cloroformio come solvente di cristallizzazione e un profilo di temperatura di 50°C come temperatura iniziale, mantenuto per 60 minuti, seguito da raffreddamento ad un regime di 1°C/h ad una temperatura finale di 20°C, mantenuto per 48 ore.

Simili conversioni sono state osservate durante lo studio di stabilità, come precedentemente osservato negli altri metodi di cristallizzazione. Nella maggior parte dei casi tutte le forme solide convertivano alla realizzazione 1a o in miscele contenenti la realizzazione 1a.

Cristallizzazione per evaporazione da miscele solide

Nella cristallizzazione evaporativa usando miscele solvente/anti-solvente, vengono preparate soluzioni trasparenti di un composto da cui il solvente evapora per primo (elevata pressione di vapore) facendo sì che il composto precipiti in qualche misura sotto forma di cristalli. Questi cristalli poi agiscono come semi quando l'anti-solvente (pressione di vapore inferiore) viene evaporato.

Composto Ex. 1 non si scioglieva completamente in ciascuno dei sistemi solventi. Per questo motivo, tutti gli esperimenti includevano la filtrazione prima dell'evaporazione.

I risultati dell'analisi HT-XRPD hanno dimostrato che il composto Ex. 1 cristallizzava principalmente come realizzazione 1s dopo evaporazione di miscele di solventi. Ciò è stato osservato per i seguenti sistemi solvente/anti-solvente: tetraidrofurano/acqua, acetonitrile/acqua, cloroformio/etanolo, metanolo/etil acetato, 2-butanone/isopropanolo, ed eptano/acetone. Da due sistemi, acetone/cumene e 1,4-diossano/etil formiato, sono state identificate le forme isostrutturali 3b e 3e, che dopo AAC convertivano in miscele diverse delle realizzazioni 1a e 3d, e 1s e 3e, rispettivamente.

Cristallizzazione da anti-solvente

Soluzioni sature di composto Ex. 1 furono preparate in solventi puri. Le aggiunte di anti-solventi sono state eseguite in aggiunte dirette e inverse. Nella aggiunta diretta, l'anti-solvente è stato aggiunto in tre aliquote alla soluzione di composto. L'aggiunta inversa è stata effettuata aggiungendo un volume di soluzione di composto ad un grande eccesso di anti-solvente (20 mL).

Dopo precipitazione, i solidi sono stati separati dai liquidi, essiccati in condizioni ambiente e essiccati sotto vuoto (5 mbar) prima di essere analizzati mediante HT-XRPD. Gli esperimenti in cui non si è verificata alcuna precipitazione dopo l'aggiunta di anti-solvente sono stati conservati a 5°C per 48 ore per indurre precipitazione. I solidi precipitati sono stati successivamente separati e analizzati mediante HT-XRPD. Quando non sono stati ottenuti solidi, le soluzioni sono state evaporate in condizioni blande e i solidi residui sono stati analizzati tramite HT-XRPD. Tutti i solidi sono stati esposti ad AAC (2 giorni a 40°C/70%RH) e sono stati rianalizzati mediante HT-XRPD.

La cristallizzazione da anti-solvente diretta mostrava precipitazione in tutti i casi. Tutti i solidi potevano essere classificati come elementi isostrutturali (1s, 1b, 1j, 1f) della realizzazione 1 o della realizzazione 3 (3b, 3d, 3f). Dopo esposizione ad AAC, tutti i campioni solidi convertivano nella realizzazione 1a, tranne uno che si convertiva in una miscela delle realizzazioni 1a e 3e.

Gli esperimenti di cristallizzazione da anti-solvente inversa eseguiti in DMSO come solvente hanno dato differenti forme solide a seconda dell'anti-solvente usato. Con diclorometano o p-xilene sono stati identificati elementi isostrutturali (1s e 1b) della realizzazione 1, mentre con MTBE è stato ottenuto un residuo amorfo.

L'evaporazione di due soluzioni con eptano ed acqua come anti-solventi che non avevano precipitato per aggiunta di anti-solvente ha portato ad un olio. Le conversioni alla realizzazione 1a sono state osservate dopo AAC e i residui amorfi diventavano deliquescenti.

Esperimenti di filtrazione a caldo

Gli esperimenti di cristallizzazione da raffreddamento con filtrazione a caldo sono stati eseguiti da soluzioni supersature del composto Ex. 1 preparato a 50°C in miscele di solventi differenti. Le soluzioni filtrate calde sono state sottoposte ad un profilo di raffreddamento di 48 ore. Le fiale in cui i solidi erano precipitati dopo il profilo di temperatura sono stati centrifugati e i solidi sono stati separati dal liquido e analizzati mediante HT-XRPD (dopo essiccamento sotto vuoto). Se nessun solido era precipitato le soluzioni venivano evaporate sotto vuoto e i solidi analizzati tramite HT-XRPD. Tutti i solidi sono stati esposti ad AAC (2 giorni a 40°C/70% RH) e rianalizzati mediante HT-XRPD. In metà degli esperimenti di filtrazione a caldo non si verificava precipitazione e in seguito ad evaporazione dei solventi, non si recuperavano solidi sufficienti a causa della scarsa solubilità del composto Ex. 1 in questi sistemi solventi. In tre esperimenti, è stato recuperato un residuo amorfo che dopo che AAC cristallizzava ad una miscela di membri della realizzazione 1 (1s o 1a) e 3 (3e) o è diventava deliquescente. La realizzazione 5 è stata identificata dall'esperimento in acetone/cloroformio (50/50, v/v). Questa realizzazione sembrava essere fisicamente instabile in quanto la conversione alla realizzazione 1a veniva osservata dopo AAC.

Esperimenti di cicli termici

Sospensioni di circa 6 mg di realizzazione 1s sono state preparate in 10 solventi a temperatura ambiente. Le sospensioni sono state fatte oscillare ciclicamente tra 5°C e 50°C. Al completamento dei cicli termici, i solidi sono stati separati mediante centrifugazione ed essiccati in condizioni ambiente e sotto vuoto (5 mbar) prima di essere analizzati tramite HT-XRPD. Successivamente, tutti i solidi sono stati esposti ad AAC per due giorni e nuovamente analizzati tramite HT-XRPD. Gli esperimenti di cicli termici solitamente promuovono la formazione della forma polimorfica più stabile. Ad eccezione dell'esperimento effettuato in cicloesano tutte le fiale contenevano solidi dopo il profilo termico. La soluzione in cicloesano è stata lentamente evaporata sotto vuoto blando. Membri delle realizzazioni 1, 3 o loro miscele sono stati identificati principalmente nei solidi

umidi. Dopo essiccamento di questi solidi, fu osservata una conversione nella realizzazione 1s. Le realizzazioni 3b e 3e sono state ottenute da cicli termici in 300 μL di cicloesano ad una concentrazione di 51 mg/mL (3b), e in 400 μL di isobutanolo ad una concentrazione di 37,3 mg/mL (3e). La realizzazione 5 è stata ottenuta mediante cicli termici in 800 μL di cloroformio a una concentrazione di 18,6 mg/mL.

Figure 3, 4 e 5 mostrano una sovrapposizione di motivi HT-XRPD per le realizzazioni elencate in Tabella 2 e anche riferite negli *screening* descritti sopra.

La realizzazione 1s è stata recuperata dalla maggior parte degli esperimenti di cristallizzazione. Si tratta di un idrato a canali avente un numero variabile di molecole di acqua e/o di altri solventi incorporati a seconda delle condizioni ambientali. Si è osservata conversione nella realizzazione 1a. Questa forma conteneva un po' più di acqua (1,3 molecole di acqua). Tutti gli elementi isostrutturali della realizzazione 1 si convertivano nella realizzazione 1a dopo esposizione a 40°C e 75% RH per due giorni. Gli spostamenti di alcuni picchi di diffrazione in motivi XRPD per membri della realizzazione 1 potrebbero essere attribuiti alle diverse molecole di solvente o acqua che sono state incorporate nel reticolo cristallino. Figura 4 mostra una sovrapposizione dei modelli HT-XRPD per membri della realizzazione 1. Il diffrattogramma 1s corrisponde al composto Ex. 1 come materiale di partenza nella realizzazione 1s. Il diffrattogramma 1a corrisponde alla realizzazione 1a che è stata ottenuta dopo esposizione ad AAC di diversi campioni della realizzazione 1s. Il diffrattogramma 1b corrisponde alla realizzazione 1b che è stata ottenuta dall'esperimento di equilibrio in solvente a RT in toluene. Il diffrattogramma 1c corrisponde alla realizzazione 1c che è stata ottenuta dall'esperimento di cristallizzazione per raffreddamento su scala μL in etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v). Il diffrattogramma 1c corrisponde alla realizzazione 1d che è stata ottenuta dall'esperimento di cristallizzazione per raffreddamento a scala μL in acetonitrile/cloroformio (50/50, v/v). Il diffrattogramma 1e corrisponde alla realizzazione 1e che è stata ottenuta dall'esperimento di cristallizzazione per raffreddamento su scala μL in etil acetato/1,4-diossano (50/50, v/v). Il diffrattogramma 1f corrisponde alla realizzazione 1f che è stata ottenuta dall'esperimento di equilibrizzazione in solvente a RT in p-xilene. Il diffrattogramma 1g corrisponde alla realizzazione 1g che è stata ottenuta dall'esperimento di equilibrizzazione in solvente a 50°C in anisolo. Il diffrattogramma 1h corrisponde alla

realizzazione 1h ottenuta dall'esperimento di cristallizzazione per raffreddamento a una scala μL in p-xilene.

I diffrattogrammi per i membri della realizzazione 3 sono mostrati in figura 5. Gli spostamenti osservati nelle differenti configurazioni HT-XRPD sono molto probabilmente attribuiti alle differenti molecole di solvente che sono state incorporate nel reticolo cristallino. La realizzazione 3 è stata ottenuta riscaldando la realizzazione da 2 a 40°C al 70% di RH per 4 giorni. Le realizzazioni da 3b a 3e erano forme solvate contenenti una quantità non stechiometrica di solvente che variava in dipendenza dal solvente incorporato nella struttura cristallina (0,3-0,7 molecole). Le miscele contenenti elementi della realizzazione 3 erano instabili dopo esposizione ad AAC e si trasformavano in alcuni casi nella realizzazione 1a o in miscele delle realizzazioni 1a e 3e. La conversione alla realizzazione 1a viene attribuita allo scambio di molecole di solvente da molecole di acqua in seguito ad esposizione ad alta umidità relativa, e ricristallizzazione alla realizzazione idratata 1a.

La realizzazione 9 è stata ottenuta riscaldando la realizzazione 2 ad una temperatura di circa 200°C seguita da raffreddamento a 25°C ed anche mediante DSC ciclica $25-200-25-300^{\circ}\text{C}$.

La realizzazione 8 è stata ottenuta riscaldando la realizzazione 5 ad una temperatura di circa 175°C .

Realizzazioni di questa invenzione includono il composto Ex. 1 in almeno una delle forme 1s, 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 2, 3b, 3c, 3d, 3e, 5, 6, 7, 8, 9, e 10. Realizzazioni di questa invenzione includono composti secondo questa invenzione nella forma di co-cristalli accettabili farmaceuticamente.

Gli Esempi 1-12 sono inibitori di JAK e sono stati provati in saggi enzimatici e cellulari. I risultati del saggio enzimatico sono presentati nella Tabella 4, che ha per titolo Risultati dei saggi di inibizione enzimatica. Gli Esempi 1-12 sono stati anche provati in tre saggi cellulari: IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3), IFN α pSTAT4 (JAK1/TYK2) e GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2) con i risultati presentati nella Tabella 5 intitolata Dati dei saggi a base cellulare. Di seguito è riportata la descrizione di come è stato eseguito il saggio enzimatico, inclusi i materiali usati nel saggio (sotto la voce Materiali), come è stato messo a punto il saggio (sotto il titolo Protocollo del saggio), e il metodo usato per analizzare i dati (sotto il titolo Metodo di spettrometria di massa ad alta resa (HTMS)).

Saggio di inibizione enzimatica

Materiali

Il substrato (NH₂-KGGEEYFELVK-CO₂), il peptide standard interno (NH₂-SWGAIETDKEYTVKD-CO₂) e il peptide prodotto (solo per la curva standard) (NH₂-KGGEEY-Pi-FELVKK-CO₂), sono stati acquistati da AnaSpec (Fremont, CA, USA). JAK1-JH1JH2 (574-1154 con una etichetta His-GST e un sito di taglio tev C-terminale (ENLYFQ-G)), JAK3-JH1JH2 (512-1124 con una etichetta GST e un sito di scissione tev C-terminale (ENLYFQ-G)), e Tyk2-JH1JH2 (8H_tev_580-1182-C936A-C1142A con un sito di scissione C-terminale (ENLYFQ-G)) sono stati purificati internamente. JAK2-JH1JH2 (532-1132 con una etichetta GST e il sito di scissione C-terminale (ENLYFQ-G)) è stato acquistato da Invitrogen. Acqua e acetonitrile (ACN) di qualità LC/MS, furono acquistati da HoneyWell, Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA). Dimetilsolfossido 99,8% (DMSO) e acido trifluoroacetico 99,5% (TFA) sono stati acquistati da EMD Chemical (Gibstown, NJ, USA). Adenosina trifosfato (ATP), acido 4-morfolinopropansolfonico (MOPS), cloruro di magnesio (MgCl₂), acido etilendiammino tetraacetico (EDTA), ditioneitrato (DTT), acido formico >95% (FA) e Tween-20 sono stati acquistati da Sigma (St Louis, MO, USA). Piastre di polipropilene a 384 pozzetti, Cat #781280 sono state acquistate da Greiner (Mondroe, NC), cartuccia RapidFire™ A C4 Colonna (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Gli esperimenti HTMS sono stati eseguiti in modalità a ionizzazione positiva su uno strumento RapidFire 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), accoppiato con un sistema ABSiex QTrap 4000 con una sorgente di ionizzazione Elettrospray (RF-MS) (Concord, ON, Canada). Il sistema RapidFire è stato eseguito con 3 pompe isocratiche della serie Agilent 1200 di Agilent Technologies (Santa Clara, CA) e una pompa peristaltica modello ISM832C da Ismatec (Wertheim, Germania). L'intero sistema è stato azionato usando il software RapidFire interfacciato con il software Analyst per lo spettrometro di massa.

Protocollo di saggio

Serie di dosaggio a 11 punti sono state realizzate per ciascun composto diluendo in serie a 1:3 o 1:4 in DMSO, il punto 12 essendo un controllo di DMSO. Dalle piastre di diluizione in serie, il campione è stato trasferito in una piastra di saggio a 384 pozzetti (#781280, Greiner, Monroe, NC) usando Labcyte Echo (Sunnyvale, CA), o

Biosero ATS (San Diego, CA). I composti sono stati provati in duplicato. La colonna 12 è stata usata per controlli positivi e la colonna 24 conteneva controlli negativi senza aggiunta di enzima. Come composto di riferimento è stato usato un composto della nostra raccolta interna, avente attività inibitoria per le isoforme di JAK. La concentrazione finale di DMSO è $\leq 0,25\%$ in una reazione di 20 μL . Le condizioni di saggio per ciascuna delle proteine sono riassunte nella Tabella 3. La reazione enzimatica è stata iniziata mediante l'aggiunta di 10 μl di enzima e miscela di ATP a 10 μl di soluzione di substrato preparata in tampone di reazione (50 mM MOPS pH 7,5, 10 mM MgCl_2 EDTA 1, mM, DTT 2 mM, Tween-20 0,002%). L'enzima Tyk2 è stato preincubato con ATP 2 mM per 30 minuti prima dell'inizio della reazione. Immediatamente dopo l'aggiunta dell'enzima alla miscela di reazione, la piastra è stata centrifugata a 1000 gpm per 1 minuto e incubata a 25°C per 45 minuti per JAK3 e 90 minuti per JAK1, JAK2 e Tyk2. La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di 20 μL di TFA allo 0,5% contenente 0,15 μM di peptide standard interno usando un erogatore di reagente Multidrop Combi (Thermo Scientific, Waltham, MA). Sono stati tipicamente usati diversi pozzetti nella colonna 24 per la curva standard del prodotto. Dopo il raffreddamento, la piastra di saggio è stata centrifugata a 3000 gpm per 3 minuti e sigillata con foglio di alluminio perforabile (Cat# 06644-001, Agilent) usando un PlateLoc (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Le piastre sono state poi trasferite sul RapidFire per l'analisi MS. L'inibizione del composto è stata valutata mediante una diminuzione dei livelli di prodotto fosforilato in pozzetti del campione rispetto alla reazione enzimatica non inibita. Le condizioni di saggio per i saggi di cui sopra sono mostrate nella Tabella 3 e i risultati di Ex. 1-12 come esaminati in questi saggi sono mostrati in Tabella 4.

Tabella 3. Condizioni di saggio per saggi di enzimi della famiglia JAK*

Enzima	[enzima], nM	[ATP] μM	[Substrato], μM	[IS], nM
JAK1-JH1JH2	8,0	12,5	200	100
JAK2-JH1JH2	7,0 o 3,6	30	40	100
JAK3-JH1JH2	2,0	150	40	100
Tyk2-JH1JH2	25 o 14,7	50	200	100

*Tampone di reazione: MOPS 50 mM, pH 7,5 10 mM MgCl₂, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, Tween-20 0,002%;

"IS" sta per peptide standard interno; "Substrato" sta per peptide.

Metodo di spettrometria di massa ad alta resa (HTMS)

L'analisi campione sul RapidFire è stata eseguita usando una fase mobile A1 costituita da Acqua/TFA/FA (100:0,01:0,1, v/v/v), una fase mobile B1 costituita da ACN/acqua/TFA/FA (80:20:0,01:0,1, v/v/v). Sono stati usati i seguenti parametri di corsa: stato 1 (aspirato), 250 ms; stato 2 (carico/lavaggio), 3000 ms; stato 3 (eluito), 4000 ms; stato 4 (riequilibrare), 1000 ms con una portata di 1,25 mL/min. I campioni sono stati aspirati direttamente dalla piastra di saggio a 384 pozzetti e applicati sulla cartuccia di estrazione in fase solida C4 in microscala RF-MS (Tipo A). Il componente indesiderato come sale, cofattore, detergente e proteine grandi è stato lavato via e gli analiti trattenuti (substrato, prodotto e IS) sono stati coeluiti direttamente sul sistema 4000 ABSiex Qtrap. La quantificazione del peptide (substrato), del fosfo-peptide (prodotto) e del peptide standard interno (IS) è stata eseguita mediante MRM usando transizioni rispettivamente di 562→136,0, 589,2→2157 e 953,2→158,8 (o 974,2→158,8).

Tabella 4. Risultati dei saggi di inibizione enzimatica

Composto di prova	JAK1_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)
A	<0,2	<0,2	12,4	0,9
B	<0,2	<0,2	13,4	<0,2
C	<0,2	0,6	49,7	0,2
Ex. 1	0,4	8,6	92,2	7,4
Ex. 2	0,2	1,0	33,9	1,5
Ex. 3	0,2	6,2	82,8	11,6
Ex. 4	0,1	6,6	96,2	2,2

Composto di prova	JAK1_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	JAK3_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)	Tyk2_I_JH1JH2 IC ₅₀ (nM)
Ex. 5	0,3	2,1	23,1	4,1
Ex. 6	0,1	1,4	28,2	1,1
Ex. 7	0,2	5,6	98,4	4,8
Ex. 8	0,4	7,0	75,6	6,6
Ex. 9	0,2	6,6	79,9	4,7
Ex. 10	1,0	6,5	87,5	9,0
Ex. 11	0,4	1,6	30,3	1,5
Ex. 12	0,9	9,4	101,3	8,7

Saggi cellulari

Saggio cellulare IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3)

Il saggio AlphaLISA (basato su Alpha Technology da PerkinElmer) è stato eseguito piastrandolo dapprima PBMC appena scongelate (Biological Specialty Corporation) in piastre da 384 pozzetti a 30.000 cellule per 4 µL per pozzetto in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) contenente 0,1% di IgG (immunoglobulina G) priva di proteasi (albumina sierica bovina) (Jackson ImmunoResearch Cat. 001-000-161). Le cellule sono state poi trattate con 2 µL/pozzetto di composti diluiti in DMSO a concentrazioni titolate semilogaritmiche, con una concentrazione di saggio più elevata di 10 µM e concentrazione finale di DMSO allo 0,5%, per trenta minuti a 37°C. Successivamente, le cellule sono state stimolate con 2 µL/pozzetto di IL-2 (R&D Systems Cat. No. 202-IL-050) a 5 ng/ml per trenta minuti a 37°C. Le reazioni cellulari sono state terminate mediante l'aggiunta di 2 µL/pozzetto di tampone di lisi (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) seguita da una incubazione di cinque minuti a temperatura ambiente. 5 µL/pozzetto di miscela di accettore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) è stato aggiunto alle cellule e incubato al buio per un'ora a temperatura ambiente. Poi, 5 µL/pozzetto della

miscela di donatore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) sono stati aggiunti alle cellule e incubati al buio per una notte a temperatura ambiente. Infine, le piastre sono state lette su un PerkinElmer EnVision per la rivelazione del segnale di fluorescenza risolto nel tempo. La percentuale di inibizione di pSTAT5 IL-2-dipendente è stata determinata alle concentrazioni di prova del composto; e per ciascun composto, è stata generata una curva di dose e l'IC₅₀ è stata calcolata. La IC₅₀ dei composti è stata calcolata mediante regressione non lineare, analisi di risposta alla dose sigmoidale della curva di titolazione di diluizione semilogaritmica della concentrazione del composto rispetto al segnale Alpha. L'acronimo "Alpha" significa un saggio omogeneo di prossimità luminescente amplificato; il segnale Alpha è un segnale luminescente/fluorescente.

Saggio cellulare IFN α pSTAT4 (JAK1/TYK2)

Il saggio AlphaLISA (basato su Alpha Technology da PerkinElmer) è stato eseguito piastrando dapprima PBMC appena scongelate (Biological Specialty Corporation) in piastre da 384 pozzetti a 100.000 cellule per 6 μ l per pozzetto in DMEM (terreno Eagle modificato da Dulbecco) contenente 10% FBS (siero bovino fetale) e 1.000 I.U./mL penicillina e 1.000 μ g/mL streptomicina. Le cellule sono state poi trattate con 2 μ L/pozzetto di composti diluiti in DMSO a concentrazioni titolate di semilogaritmo, con una concentrazione di prova massima di 10 μ M e concentrazione finale di DMSO allo 0,5%, per trenta minuti a 37°C. Successivamente, le cellule sono state stimulate con 2 μ L/pozzetto di IFN α (PBL Assay Science Cat. 11101-2) a 4 ng/ml per trenta minuti a 37°C. Le reazioni cellulari sono state terminate mediante l'aggiunta di 2 μ L/pozzetto di tampone di lisi (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST4-A10K) seguito da una incubazione di cinque minuti a temperatura ambiente. 4 μ L/pozzetto di miscela di accettore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST4-A10K) sono stati aggiunti alle cellule e incubati al buio per un'ora a temperatura ambiente. Poi, 4 μ L/pozzetto della miscela di donatore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST4-A10K) sono stati aggiunti alle cellule e incubati al buio per una notte a temperatura ambiente. Infine, le piastre sono state lette su un PerkinElmer EnVision per la rivelazione del segnale di fluorescenza risolto nel tempo. La percentuale di inibizione di pSTAT4 dipendente da IFN α è stata determinata alle concentrazioni del composto di prova; e per ciascun composto, è stata generata una curva di dose e l'IC₅₀ è stata calcolata. La IC₅₀ è stata calcolata mediante regressione non lineare, analisi di risposta della dose sigmoidale della curva di

titolazione di diluizione semilogaritmica della concentrazione del composto rispetto al segnale Alpha. Il termine "Alpha" è definito nella descrizione di saggio cellulare immediatamente precedente.

Saggio cellulare GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2)

Il saggio AlphaLISA (basato su Alpha Technology da PerkinElmer) è stato eseguito piastrando dapprima PBMC appena scongelate (Biological Specialty Corporation) in piastre da 384 pozzetti a 30.000 cellule per 4 μ l per pozzetto in HBSS contenente 0,1% di BSA priva di IgG e proteasi (Jackson ImmunoResearch Cat. 001-000-161). Le cellule sono state poi trattate con 2 μ L/pozzetto di composti diluiti in DMSO a concentrazioni titolate semilogaritmiche, con una concentrazione massima di prova di 10 μ M e concentrazione finale di DMSO allo 0,5%, per trenta minuti a 37°C. Successivamente, le cellule sono state stimolate con 2 μ L/pozzetto di GM-CSF (R&D Systems Cat. No. 215-GM-050) a 11 μ g/ml per quindici minuti a 37°C. Le reazioni cellulari sono state terminate mediante l'aggiunta di 2 μ L/pozzetto di tampone di lisi (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) seguito da una incubazione di cinque minuti a temperatura ambiente. 5 μ L/pozzetto di miscela di accettore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) sono stati aggiunti alle cellule e incubati al buio per un'ora a temperatura ambiente. Poi, 5 μ L/pozzetto di miscela di donatore (PerkinElmer Cat. No. ALSU-PST5-A10K) sono stati aggiunti alle cellule e incubati al buio per una notte a temperatura ambiente. Infine, le piastre sono state lette su un PerkinElmer EnVision per la rivelazione del segnale di fluorescenza risolto nel tempo. La percentuale di inibizione di pSTAT5 GM-CSF-dipendente è stata determinata alle concentrazioni del composto di prova; e per ciascun composto è stata generata una curva di dose ed è stata calcolata l'IC₅₀. La IC₅₀ del composto è stata calcolata mediante regressione non lineare, analisi di risposta della dose sigmoidale della curva di titolazione di diluizione semilogaritmica della concentrazione del composto rispetto al segnale Alpha. Il termine "Alpha" è definito nella descrizione del saggio cellulare IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3).

Tabella 5. Dati di saggio a base di cellule

Composto di prova	IL-2 pSTAT5 (JAK1/JAK3) IC ₅₀ (nM)	IFN α pSTAT4 (JAK1/TYK2) IC ₅₀ (nM)	GM-CSF pSTAT5 (JAK2/JAK2) IC ₅₀ (nM)
Ex. 1	21,6	59,5	83,9

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

Gli Esempi 1-12 sono stati provati in saggi di solubilità e permeabilità. I risultati del saggio di solubilità sono presentati in Tabella 6 che è intitolata Dati del saggio di solubilità e i risultati del saggio di permeabilità sono presentati in Tabella 7 intitolato Dati di permeabilità MDCK-MDR1. Questi saggi di solubilità e permeabilità sono descritti di seguito, rispettivamente, sotto le voci Saggi di solubilità e Saggi di permeabilità.

Saggi di solubilità

Misure di solubilità sono state condotte nei seguenti mezzi di solubilità: fluido gastrico simulato (34,2 mM di sodio cloruro e 100 mM di acido cloridrico) o fluido intestinale simulato (stato a digiuno [pH 6,5]: 3 mM di sodio taurocolato, 0,75 mM di lecitina, 28,4 mM di sodio fosfato monobasico, 8,7 mM di sodio idrossido, e 105,9 mM di sodio cloruro). I composti di prova sono stati disciolti in DMSO ad una concentrazione di 10 mM. I composti di prova sono stati distribuiti (20 μ L) in piastre Nunc 1-mL-96-Deep-Well-PP, e il DMSO è stato

evaporato tramite irrorazione di azoto da un TurboVap 96 per 6 ore o fino a che si produceva un residuo secco. Poi, 400 μL di mezzi di solubilità sono stati aggiunti al pozzetto contenente il solido secco. Un Pre-Slit Well Cap è stato collocato in modo sicuro sopra il blocco di piastra a pozzetti, e i campioni sono stati agitati vigorosamente per 2-5 giorni a temperatura ambiente. Dopo il periodo di incubazione, i campioni sono stati filtrati attraverso una piastra filtrante AcroPrep 1-mL-96 in una nuova piastra da 2-mL-96-Deep-Well-PP, e i surnatanti sono stati quantificati mediante UV-HPLC usando una calibrazione a 3 punti che varia da 0,004-0,55 mM. La solubilità per ciascun composto è stata calcolata dalla seguente equazione:

$$\text{Solubilità} = \frac{\text{Area di picco del campione}}{\text{Fattore di risposta medio da 3 standard}}$$

I valori di solubilità erano nell'intervallo di 4 - 400 μM . I valori al di fuori di questo intervallo sono stati riportati come $<4 \mu\text{M}$ o $>400 \mu\text{M}$. Le solubilità sono riportate purché il composto in studio sia sufficientemente stabile da completare la corrispondente determinazione di solubilità.

Tabella 6. Dati dei saggi di solubilità

Composto di prova	Solubilità SGF (μM)	Solubilità SIF (μM)
A	>400	>400
B	>400	75
C	>400	>400
Ex. 1	>400	387
Ex. 2	>400	>400
Ex. 3	>400	>400
Ex. 4	>400	>400
Ex. 5	>400	198
Ex. 6	>400	>400

Composto di prova	Solubilità SGF (μM)	Solubilità SIF (μM)
Ex. 7	>400	81
Ex. 8	>400	>400
Ex. 9	>400	>400
Ex. 10	>400	359
Ex. 11	>400	>400
Ex. 12	>400	>400

Saggi di permeabilità

Le misurazioni di permeabilità sono state condotte secondo il protocollo Cypotex usando la linea cellulare MDCK-MDR1 ottenuta da NIH (Rockville, MD, USA). Le cellule tra i numeri di passaggio 6 - 30 sono state seminate su una piastra Multiscreen™ (Millipore) a una densità cellulare di $3,4 \times 10^5$ cellule/cm² e coltivate per tre giorni prima di eseguire studi di permeabilità. Le cellule in questo saggio formano un foglio coesivo di un singolo strato cellulare che riempie l'area superficiale della piastra di coltura, noto anche come monostrato confluyente, e il giorno quattro il composto di prova è stato aggiunto al lato apicale della membrana e il trasporto del composto attraverso il monostrato è stato monitorato per un periodo di tempo di 60 minuti.

In un modo semplice e basilare di introdurre termini "A" e "B" che sono spesso usati in questi saggi, il lato o compartimento apicale ("A") di un'entità è il lato di tale entità che è esposto al lume o all'ambiente esterno, mentre il lato o compartimento basolaterale ("B") è il lato o compartimento di tale entità che è esposto all'ambiente tipicamente interno, comprendente il lato opposto. Per esempio, quando tale entità è illustrativamente una cellula di epitelio intestinale, il lato apicale di tale cellula intestinale sarebbe il lato della cellula esposto al lume intestinale, mentre il lato basolaterale sarebbe il lato che è esposto al sangue.

I composti di prova sono stati disciolti in DMSO ad una concentrazione di 10 mM. Le soluzioni di dosaggio sono state preparate diluendo il composto di prova con tampone per saggio (Hanks Balanced Salt Solution), pH 7,4, ad una concentrazione finale di 5 μM . Per la valutazione della permeabilità da apicale a basolaterale ("A-

B"), il tampone è stato rimosso dal compartimento apicale e sostituito con una soluzione di dosaggio del composto di prova con o senza l'inibitore della glicoproteina di permeabilità ("PgP", "P-gP", "Pgp" o "P-gp") elacridar (2 μ M). Per la valutazione della permeabilità da basolaterale ad apicale ("B-A"), il tampone è stato rimosso dalla piastra compagna e sostituito con soluzione di dosaggio del composto di prova. Le incubazioni sono state eseguite in duplicato a 37°C in atmosfera di 5% CO₂ con un'umidità relativa del 95%. Ciascun saggio includeva i marcatori di riferimento propranololo (elevata permeabilità) e prazosin (substrato di PgP). Dopo incubazione per 60 minuti, campioni apicali e basolaterali sono stati diluiti e composti di prova quantificati mediante LC/MS/MS usando una calibrazione a 8 punti nell'intervallo da 0,0039 a 3 μ M con diluizione appropriata dei campioni (fattore di diluizione del ricevitore = 1; fattore di diluizione donatore e C₀ = 10). Coefficiente di permeabilità (P_{app}) per ciascun composto è stato calcolato dalla seguente equazione: $P_{app} = (dQ/dt) / (C_0 \times S)$, dove dQ/dt è il tasso di permeazione del farmaco attraverso le cellule, C₀ è la concentrazione del compartimento donatore nel tempo zero, e S è l'area del monostrato cellulare.

Il recupero percentuale è stato misurato per tutte le condizioni di incubazione. Queste misurazioni non rivelavano un legame di composto/piastra inaccettabile o un accumulo di composto nel monostrato cellulare.

La seconda e la terza colonna in Tabella 7 mostrano i valori di P_{app(A-B)} per il trasporto di composto apicale-basolaterale senza (seconda colonna) e con un inibitore di P-gp (terza colonna, indicato come P^e_{app(A-B)}) che era elacridar. P_{app(A-B)} fornisce un'indicazione del grado di permeazione attraverso le cellule in questo saggio, che è previsto per modellare il trasporto transcellulare attraverso cellule esprimenti Pgp, come cellule del tratto gastrointestinale esprimenti Pgp. I valori di P^e_{app(A-B)} (P_{app(A-B)} in presenza dell'inibitore di P-gp) riportati nella colonna 3 vengono determinati a confermare il ruolo di P-gp nell'efflusso del composto. La quarta colonna in Tabella 7 mostra i valori di P_{app(B-A)} per il trasporto di composti basolaterale-apicale. I rapporti di efflusso del composto di prova sono riportati nella quinta colonna della Tabella 7 come P_{app(B-A)}/P_{app(A-B)} usando i corrispondenti valori del coefficiente di permeabilità della quarta e seconda colonna nella stessa tabella. I rapporti di efflusso (quinta colonna, Tabella 7) sono costantemente maggiori di 2 per i composti (A) - (C) e anche per i composti Ex. 1-12, che indica che l'efflusso del composto si verifica per tutti tali composti.

I valori di $P_{app(A-B)}$ nella colonna 2 sono generalmente bassi e comparabili per i composti di riferimento (A) - (C) e anche per i composti Ex. 1-12. Questi bassi valori indicano una bassa permeabilità per tutti questi composti, dovuta agli effetti di P-gp poiché tutti questi composti sono substrati di P-gp come indicato dai valori riportati nella colonna 5 che sono tutti superiori a 2. Per essere caratterizzati come aventi bassa permeabilità, i valori riportati nella terza e quarta colonna per $P_{app(A-B)}$ e $P_{app(B-A)}$ rispettivamente, dovrebbe essere basso. Tuttavia, questi dati mostrano che i valori di $P_{app(B-A)}$ per i composti (A) - (C) sono maggiori dei corrispondenti composti Ex. 1-12.

L'integrità di ciascun monostrato è stata monitorata esaminando la permeazione di Lucifer Yellow mediante analisi fluorimetrica. Questo esame ha rivelato che le cellule in questo saggio mantenevano un monostrato confluento soddisfacente.

Tabella 7. Dati sulla permeabilità in MDCK-MDR1

Composto di prova**	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}^e$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	MDCK-MDR1 $P_{app(B-A)}$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	$P_{app(B-A)} / P_{app(A-B)}$
A	1,3	22	55,3	43
B	0,4	1,7	23,5	59
C	0,5	2,5	23,1	46
Ex. 1	<0,5, 0,4	<0,5, 1,1	0,9, 1,1	>1,9, 3,3
Ex. 2*	1,1	1,6	4,8	4,4
Ex. 3	<0,4, <0,5	2,3, 1,6	17, 16	>41, >33
Ex. 4	0,1	0,5	1,3	8,7
Ex. 5	<0,4, <0,5	0,7, 0,5	1,8, 2,1	> 4,8, >4,5
Ex. 6	<0,3, <0,3	0,9, 1,1	2,5, 2,6	> 8,4, >8,7
Ex. 7	<0,4	1,2	3,6	>9

Composto di prova**	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	MDCK-MDR1 $P_{app(A-B)}^c$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	MDCK-MDR1 $P_{app(B-A)}$ (10^{-6} cm/sec) @ 5 (μ M)	$P_{app(B-A)} / P_{app(A-B)}$
Ex. 8	0,1	0,5	1,7	11,5
Ex. 9	<0,4	0,6	1,8	> 4,2
Ex. 10	<0,4	1,1	7,1	> 16,9
Ex. 11	<0,4	0,8	1,1	> 2,9
Ex. 12	<0,5	0,6	1,1	> 2,2

* La concentrazione di partenza è stata misurata essere $>7 \mu$ M per condizioni da A a B, da A a B (con elacridar) e da B a A.

** Salvo indicazione contraria, i composti (A) - (C) e Ex. 1-12 sono stati provati ad una concentrazione di 5μ M.

Per i dati mostrati in cellule con due punti di dati, i composti sono stati provati due volte.

Studi *in vivo*

Dosaggio orale - Protocollo 1

Tre topi C57BL/6 femmine non a digiuno sono stati trattati per via orale di un composto di prova alla dose di 25 mg/kg p.o. come soluzione in idrossipropil-beta-ciclodestrina al 20% (HP β CD) ad un volume della dose di 5 mL/kg. Campioni di sangue sono stati raccolti a 0,5, 2 e 4 h dopo la dose tramite prelievo retro-orbitale o puntura venosa della vena metatarsale dorsale. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti anticoagulante (eparina-Na) e posti su ghiaccio umido. La frazione di plasma è stata separata mediante centrifugazione e congelata a -20° C per un massimo di 4 h e -80° C dopo 4 h se non analizzata subito dopo la raccolta del campione. I campioni di colon sono stati raccolti a 4 ore dopo la dose. Dall'inizio del cieco, è stato sezionato un campione di 4-6 cm del colon, tagliato sull'asse longitudinale, e il contenuto solido rimosso mediante lavaggio con 2 mL di soluzione salina. Il colon è stato inoltre lavato ponendolo in 5 mL di soluzione salina e agitato per 5 secondi. Il campione del colon è stato poi asciugato per tamponatura, pesato e omogeneizzato come 1 parte di tessuto (g) su 4 parti di acqua di qualità HPLC (mL). Le concentrazioni del

composto in plasma ed omogenato di colon sono state determinate usando un metodo di cromatografia liquida - spettrometria di massa a triplo quadrupolo qualificato (LC-MS/MS). Questo protocollo è stato usato per valutare i seguenti composti di prova: Composti (B) e (C) e Esempi 6 e 11.

Dosaggio orale - Protocollo 2

Tre topi C57BL/6 femmine non a digiuno sono stati trattati per via orale con un composto di prova alla dose di 25 mg/kg p.o. come soluzione in HP β CD al 20% con un volume della dose di 5 mL/kg. I campioni di sangue sono stati raccolti a 0,5, 2 e 4 ore dopo la dose tramite prelievo retro-orbitale o vena metatarsale dorsale. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti anticoagulante (eparina-Na) e posti su ghiaccio umido. La frazione di plasma è stata separata mediante centrifugazione e congelata a -20°C per un massimo di 4 h e -80°C dopo 4 h se non analizzata subito dopo la raccolta del campione. I campioni di colon sono stati raccolti a 4 ore dopo la dose. Da 2 cm al di sotto del cieco, un campione di 4 cm del colon è stato sezionato, tagliato sull'asse longitudinale, e il contenuto solido è stato rimosso mediante lavaggio con 2 mL di soluzione salina. Il colon è stato inoltre lavato ponendolo in 5 mL di soluzione salina e agitato per 5 secondi. Il campione del colon è stato poi asciugato per tamponatura, pesato e omogeneizzato come 1 parte di tessuto (g) a 4 parti di acqua di qualità HPLC (mL). Le concentrazioni del composto in plasma ed omogenato di colon sono state determinate usando un metodo qualificato di cromatografia liquida - spettrometria di massa a triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Questo protocollo è stato usato per valutare i seguenti composti di prova: Composto (A) e Esempi 1-5, 7-10 e 12.

Dosaggio IC - Protocollo 3

Gruppo di dosaggio intra-colon (IC): Dopo anestesia con isoflurano mediante inalazione, a tre topi femmine C57BL/6 non a digiuno sono stati trattati con il composto per via intra-colon attraverso una piccola incisione nella parete addominale usando una siringa e un ago a una dose di 5 mg/kg come soluzione in HP β CD al 20% a un volume di dose di 1 mL/kg. I campioni di sangue sono stati raccolti a 0,5, 2 e 4 ore dopo la dose tramite prelievo retro-orbitale. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette contenenti anticoagulante (eparina-Na) e posti su ghiaccio umido. La frazione di plasma è stata separata mediante centrifugazione e congelata a -

20°C per un massimo di 4 h e -80°C dopo 4 h se non analizzata subito dopo la raccolta del campione. I campioni di colon sono stati raccolti 4 ore dopo la dose. Da 2 cm al di sotto del cieco, è stato sezionato un campione di 4 cm del colon, tagliato sull'asse longitudinale, e il contenuto solido rimosso mediante lavaggio con 2 mL di soluzione salina. Il colon è stato inoltre lavato ponendolo in 5 mL di soluzione salina e agitato per 5 secondi. Il campione del colon è stato poi asciugato, pesato e omogeneizzato come 1 parte di tessuto (g) a 4 parti di acqua di qualità HPLC (mL). Le concentrazioni del composto in plasma ed omogenato di colon sono state determinate usando un metodo qualificato di cromatografia liquida - spettrometria di massa a triplo quadrupolo (LC-MS/MS). Questo protocollo è stato usato per valutare il dosaggio IC dei seguenti composti di prova: Esempi 1, 3 e 4.

Composti Ex. 1-12 sono inoltre caratterizzati dalle proprietà chimico-fisiche riportate in Tabella 8. I valori di cLogP e tPSA sono stati calcolati usando ChemBioDraw Ultra 14.0, dove P è il coefficiente di ripartizione n-octanolo-acqua. L'area di superficie polare totale (tPSA) è calcolata come la somma di superficie su tutti gli atomi polari, principalmente ossigeno e azoto, inclusi anche i loro idrogeni attaccati.

Tabella 8. Alcune proprietà chimico-fisiche dei composti Ex. 1 - 12

Composto di prova	cLog P	tPSA	# donatori legami H	# accettori legami H	# legami ruotabili
Ex. 1	0,94	113,11	3	5	6
Ex. 2	2,31	88,17	2	4	3
Ex. 3	1,58	92,88	2	4	6
Ex. 4	0,54	116,67	2	5	6
Ex. 5	0,24	102,11	2	5	5
Ex. 6	0,86	102,11	2	5	6
Ex. 7	1,25	116,67	2	5	6
Ex. 8	1,13	113,11	3	5	6

Composto di prova	cLog P	tPSA	# donatori legami H	# accettori legami H	# legami ruotabili
Ex. 9	1,14	108,48	2	5	5
Ex. 10	1,35	116,67	2	5	6
Ex. 11	1,50	117,27	3	5	5
Ex. 12	0,57	113,11	3	5	6

RIVENDICAZIONI

1. Composto scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2*H*-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

2. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2H-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

3. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2H-piran-

4-il)acetammide;

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

4. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetonitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni,

opzionalmente in cui detto composto è:

(a) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide; o

(b) 2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetonitrile; o

(c) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide.

5. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-

d]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1*H*-pirazol-3-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

6. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2*H*-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

7. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-

idrossiciclobutil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

8. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

9. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni,

opzionalmente in cui detto composto è scelto da:

(a) il gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni; o

(b) il gruppo costituito da

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni; o

(c) il gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni.

10. Composto come rivendicato nella rivendicazione 1, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((*1r,4r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetanitrile;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(ciclopropilmetil)acetammide;

N-(2-Cianoetil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(tetraidro-2*H*-piran-4-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((tetraidro-2*H*-piran-4-il)metil)acetammide;

N-(2-Ciano-2-metilpropil)-2-(1-((*1r,4r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclobutil)metil)acetammide;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)acetammide;

N-(4-(Cianometil)biciclo[2.2.1]eptan-1-il)-2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)acetammide;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(1*H*-pirazol-3-il)acetammide;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro co-cristalli accettabili farmaceuticamente.

11. Composto come rivendicato nella rivendicazione 10 scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro co-cristalli accettabili farmaceuticamente.

12. Composizione farmaceutica comprendente una quantità terapeuticamente efficace di almeno un composto come rivendicato nella rivendicazione 1.

13. Composizione farmaceutica come rivendicata nella rivendicazione 12, in cui detto composto è scelto dal gruppo costituito da

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide;

2-((1*r*,4*r*)-4-(2-(1*H*-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6*H*)-il)cicloesil)acetoneitrile;

2-(1-((1*r*,4*r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide; e

loro sali accettabili farmaceuticamente, e combinazioni,

opzionalmente in cui detto composto è:

- (a) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-(2-idrossi-2-metilpropil)acetammide; o
- (b) 2-((*1r,4r*)-4-(2-(1H-Imidazol-4-il)imidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-1(6H)-il)cicloesil)acetonitrile; o
- (c) 2-(1-((*1r,4r*)-4-(Cianometil)cicloesil)-1,6-diidroimidazo[4,5-*d*]pirrolo[2,3-*b*]piridin-2-il)-*N*-((1-idrossiciclopropil)metil)acetammide.

Si dichiara che la presente traduzione è perfettamente conforme al testo originale.

Il mandatario

Società Italiana Brevetti S.p.A.

LEGENDA – DISEGNI

FIGURA 1	
Pan-JAK inhibitor	Inibitore pan-JAK
JAK-STAT signaling pathway and inflammation	Percorso di segnalazione JAK-STAT e infiammazione
FIGURA 3	
Relative intensity	Intensità relativa
FIGURA 4	
Relative intensity	Intensità relativa
FIGURA 5	
Relative intensity	Intensità relativa
FIGURA 6	
Relative intensity	Intensità relativa

FIG. 1

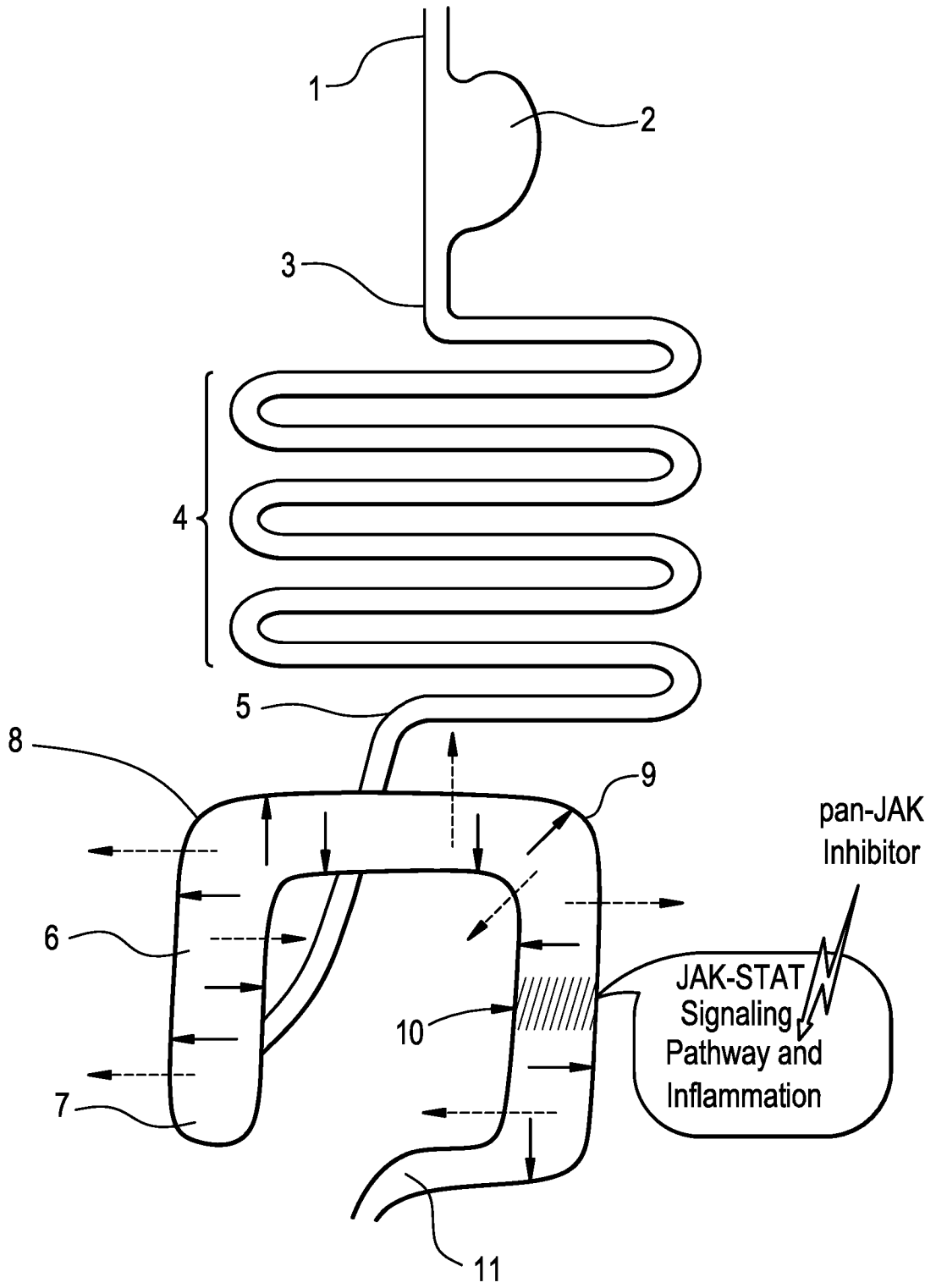


FIG. 2

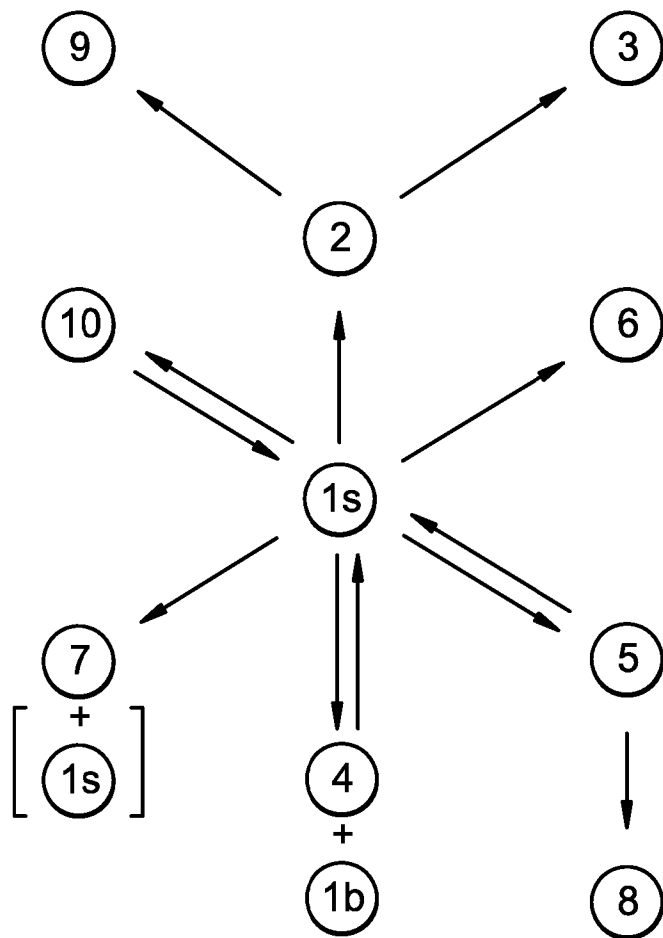


FIG. 3

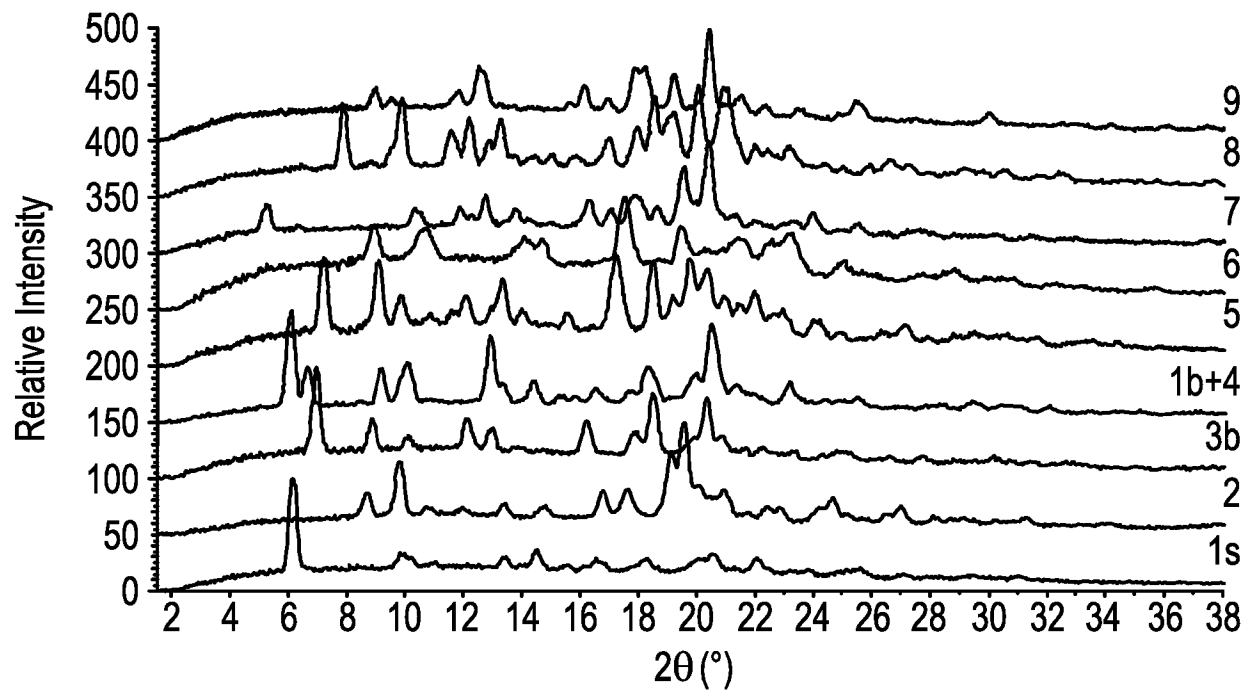


FIG. 4

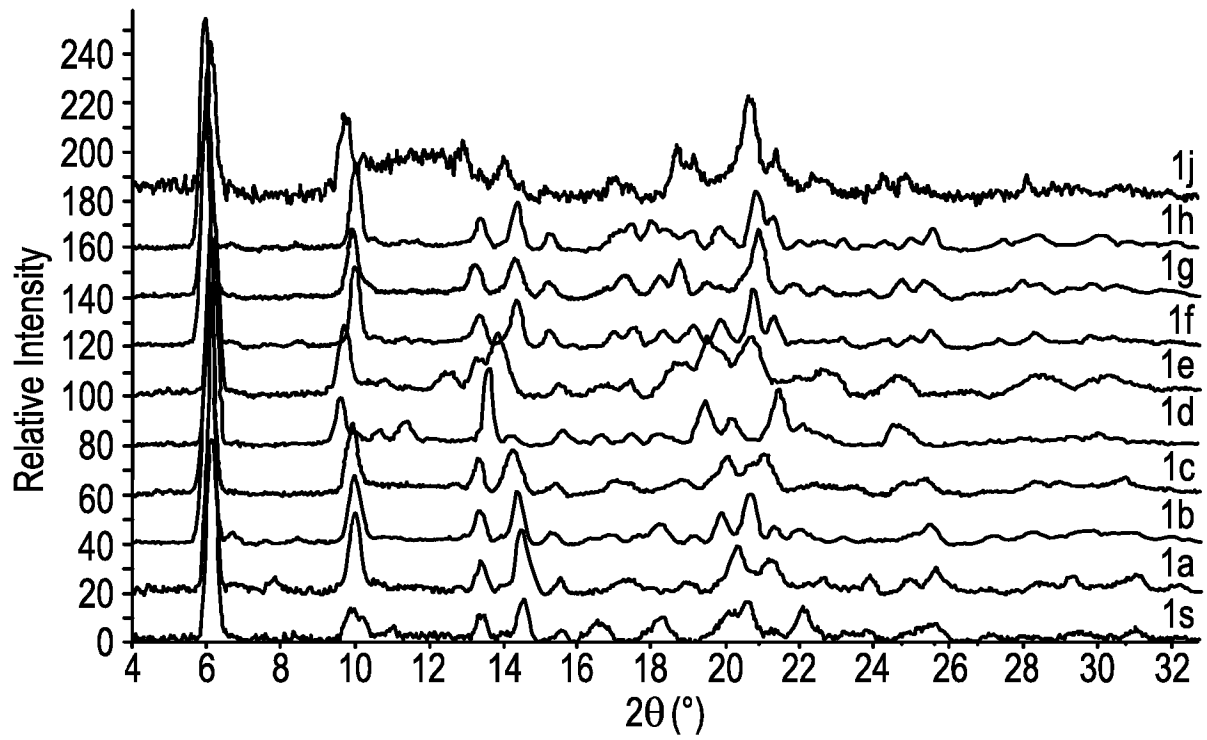


FIG. 5

