



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127925** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61K 31/4155** (2006.01)  
**A61K 31/437** (2006.01)  
**A61P 17/10** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>a 2020 06949</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>29.03.2019</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>15.02.2024</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>62/650,600</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>30.03.2018</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>24.02.2021, Бюл.№ 8</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>14.02.2024, Бюл.№ 7</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2019/024998, 29.03.2019</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Гауелл Майкл Д. (US), Сміт Пол (US)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>ІНСАЙТ КОРПОРЕЙШН,</b> 1801 Augustine Cut-Off, Wilmington, Delaware 19803, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: HARUMI OCHI et al. The effect of oral clindamycin and rifampicin combination therapy in patients with hidradenitis suppurativa in Singapore // CLINICAL, COSMETIC AND INVESTIGATIONAL DERMATOLOGY, doi:10.2147/CCID.S136730. - 01.01.2018. - Vol. 11. - P. 37-39 WO 2017/143014 A1, 24.08.2017 WO 2014/186706 A1, 20.11.2014</p>
--	--

**(54) ЛІКУВАННЯ ГНІЙНОГО ГІДРАДЕНІТУ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНГІБІТОРІВ JAK**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу лікування гнійного гідраденіту, що включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки, яка інгібує JAK1, причому сполука являє собою 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н,1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.

**UA 127925 C2**



У цій заявці витребується пріоритет за попередньою заявкою США № 62/650600, поданою 30 березня 2018 р., яка повністю включена в цей документ шляхом посилання.

#### ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

У цій заявці представлені способи лікування гнійного гідраденіту (HS - англ.: hidradenitis suppurativa) з використанням сполук, які модулюють активність кінази Janus (JAK) 1 і/або 2.

#### РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Протеїнкінази (PK) регулюють різні біологічні процеси, включаючи, серед іншого, ріст клітин, виживання, диференціювання, формування органів, морфогенез, неоваскуляризацію, відновлення тканин і регенерацію. Протеїнкінази також відіграють спеціалізовані ролі в безлічі хвороб людини, включаючи рак Цитокіни, низькомолекулярні поліпептиди або глікопротеїни регулюють багато шляхів, які беруть участь у запальній реакції господаря на сепсис. Цитокіни впливають на диференціювання, проліферацію і активацію клітин і можуть модулювати як прозапальні, так і протизапальні реакції, даючи змогу господарю належним чином реагувати на патогени. Передача сигналів широкого діапазону цитокінів включає сімейство кіназ Януса (JAK) протеїнтирозинкіназ і сигнальних перетворювачів і активаторів транскрипції (STAT). Існує чотири відомих JAK ссавців: JAK1 (кіназа Януса-1), JAK2, JAK3 (також відома як кіназа Януса, лейкоцитарна; JAKL; і L-JAK) і TYK2 (протеїн-тирозинкіназа 2).

Імунні і запальні реакції, стимульовані цитокінами, сприяють патогенезу захворювань: такі патології як важкий комбінований імунodefіцит (SCID) виникають через пригнічення імунної системи, в той час як гіперактивна або невідповідна імунна/запальна відповідь сприяє патології аутоімунних захворювань (наприклад, астми, системного червоного вовчака, тиреоїдиту, міокардиту) і таких захворювань, як склеродермія і остеоартрит (Ortmann, R. A., T. Cheng, et al. (2000) Arthritis Res 2(1): 16–32).

Порушення експресії JAK пов'язані з багатьма хворобливими станами. Наприклад, Jak1-/- миші дрібні при народженні, не в змозі годуватися грудьми і вмирають в перинатальний період (Rodig, S. J., M. A. Meraz, et al. (1998) Cell 93(3): 373-3). Ембріони Jak2-/- мишей анемічні і вмирають приблизно на 12,5 день після спарювання через відсутність дефінітивного еритропоєзу.

Шлях JAK/STAT і, зокрема, всі чотири JAK, як вважають, відіграють роль у патогенезі астматичної відповіді, хронічної обструктивної хвороби легень, бронхіту та інших пов'язаних запальних захворювань нижніх дихальних шляхів. Множинні цитокіни, які передають сигнал через JAK, були пов'язані із запальними захворюваннями/станами верхніх дихальних шляхів, як-от такими, що вражають ніс і носові пазухи (наприклад, риніт і синусит), незалежно від того, чи є вони класичними алергічними реакціями чи ні. Шлях JAK/STAT також залучений у запальні захворювання/стани очей і хронічні алергічні реакції.

Активация JAK/STAT при раку може відбуватися шляхом стимуляції цитокінів (наприклад IL-6 або GM-CSF) або шляхом зменшення ендогенних супресорів передачі сигналів JAK, як-от SOCS (супресор або передача сигналів цитокінів) або PIAS (білковий інгібітор активованого STAT) (Boudny, V., and Kovarik, J., Neoplasms. 49:349-355, 2002). Активация передачі сигналів STAT, а також інших шляхів нижче JAK (наприклад, Akt), корелювала з поганим прогнозом при багатьох типах раку (Bowman, T., et al. Oncogene 19:2474-2488, 2000). Підвищені рівні циркулюючих цитокінів, які передають сигнал через JAK/STAT, відіграють причинну роль в кахексії і/або хронічній втомі. Таким чином, інгібування JAK може бути корисним для онкологічних хворих з причин, які виходять за рамки потенційної протипухлинної активності.

Тирозинкіназа JAK2 може бути корисною для пацієнтів з мієлопроліферативними захворюваннями, наприклад справжньою поліцитемією (PV - англ.: polycythemia vera), есенціальною тромбоцитемією (ET), мієлоїдною метаплазією з мієлофіброзом (MMM-myeloid metaplasia with myelofibrosis). (Levin, et al., Cancer Cell, vol. 7, 2005: 387-397). Інгібування кінази JAK2V617F знижує проліферацію гемопоетичних клітин, що дозволяє припустити, що JAK2 є потенційною мішенню для фармакологічного інгібування у пацієнтів з PV, ET і MMM.

Інгібування JAK може принести користь пацієнтам, що страждають на шкірні імунні порушення, як-от псоріаз, і сенсibiliзацію шкіри. Вважається, що підтримання патологічного процесу при псоріазі залежить від низки запальних цитокінів на додаток до різних хемокінів і факторів росту (JCI, 113: 1664-1675), багато з яких передають сигнал через JAK (Adv Pharmacol. 2000;47:113-74).

Таким чином, нові або поліпшені агенти, які інгібують кінази, як-от JAK, постійно необхідні для розробки нових і більш ефективних фармацевтичних препаратів, націлених на посилення або пригнічення імунних і запальних шляхів, як-от лікування гнійного гідраденіту. Ця заявка призначена для цієї та інших потреб.

60 СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

У цій заявці представлені способи лікування гнійного гідраденіту у пацієнта, що потребує цього, які включають введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки, яка інгібує JAK1 і/або JAK2, або її фармацевтично прийнятної солі.

У деяких варіантах реалізації сполука або сіль є селективними щодо JAK1 і JAK2, які є селективними у порівнянні з JAK3 і TYK2.

У деяких варіантах реалізації сполука або сіль є селективними щодо JAK1 у порівнянні з JAK2, JAK3 та TYK2.

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою руксолітиніб або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою руксолітиніб або його фармацевтично прийнятну сіль, в якій один або кілька атомів водню замінені атомами дейтерію.

У деяких варіантах реалізації сіль являє собою фосфат руксолітинібу.

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою  $\{1-\{1-[3\text{-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиноіл}]\text{піперидин-4-іл}\}-3[4-(7\text{H-піроло}[2,3\text{-d}]\text{піримідин-4-іл})\text{-1H-піразол-1-іл}]\text{азетидин-3-іл}\}$ ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації сіль являє собою адипінат  $\{1-\{1-[3\text{-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиноіл}]\text{піперидин-4-іл}\}-3[4-(7\text{H-піроло}[2,3\text{-d}]\text{піримідин-4-іл})\text{-1H-піразол-1-іл}]\text{азетидин-3-іл}\}$ ацетонітрилу

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1H, 1'H-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації сіль являє собою фосфат 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1H, 1'H-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензаміду

У деяких варіантах реалізації сполуку або сіль вводять в дозуванні 15, 30, 60 або 90 мг в перерахунку на вільну основу

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1H-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2H-піран-2-іл)ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1H-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2H-піран-2-іл)ацетонітрил моногідрат

У деяких варіантах реалізації способи додатково включають введення додаткового терапевтичного агента (наприклад, антибіотика, ретиноїду, кортикостероїду, анти-TNF-альфа агента або імунодепресанту).

У деяких варіантах реалізації введення сполуки або солі є місцевим. У деяких варіантах реалізації сполуку або сіль вводять перорально.

У деяких варіантах реалізації метод призводить до 10 %, 20 %, 30 %, 40 % або 50 % поліпшення HiSCR (Hidradenitis Suppurativa Clinical Response - клінічна відповідь на гнійний гідраденіт).

У цій заявці також запропонована сполука, яка інгібує JAK1 і/або JAK2, або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування при лікуванні гнійного гідраденіту.

Ця заявка додатково забезпечує застосування сполуки, яка інгібує JAK1 і/або JAK2, або її фармацевтично прийнятної солі для приготування лікарського засобу для застосування в лікуванні гнійного гідраденіту.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На Фіг. 1 показані значення експресії індивідуальних генів (MFI) для JAK1 для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності Сполук А-Д. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді рівнів експресії JAK1 для кожної групи.

На Фіг. 2 показані значення експресії індивідуальних генів (MFI) для JAK2 для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності Сполук А-Д. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді рівнів експресії JAK2 для кожної групи.

На Фіг. 3 показані значення експресії індивідуальних генів (MFI) для IL-1 $\alpha$  для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності Сполук А-Д. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді рівнів експресії IL-1 $\alpha$  для кожної групи.

На Фіг. 4 показані значення експресії індивідуальних генів (MFI) для IL-6 для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності Сполук А-D. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді рівнів експресії IL-6 для кожної групи.

На Фіг. 5 показані концентрації індивідуальних білків (пг/мл) для IL-1 $\alpha$  для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності Сполук А-D. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді концентрацій IL-1 $\alpha$  для кожної групи.

На Фіг. 6 показані концентрації індивідуальних білків (пг/мл) для IL-6 для кожної експериментальної реплікації в кератиноцитах, що моделюються за допомогою TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності сполук А-D. Кератиноцити стимулювали TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл) в присутності/відсутності зростаючих концентрацій інгібіторів JAK. Дані представлені у вигляді концентрацій IL-6 для кожної групи.

На Фіг. 7 показана експресія гена (MFI) JAK1, JAK3 і TYK2 в шкірі здорових людей контрольної групи і суб'єктів з гнійним гідраденітом. Дані представлені у вигляді рівнів експресії генів JAK1, JAK3 або TYK2 для кожного здорового контрольного (n=4) суб'єкта і суб'єкта з гнійним гідраденітом (n=41).

На Фіг. 8 показана експресія генів (MFI) STAT1, STAT2 і STAT3 в шкірі здорових суб'єктів контрольної групи і суб'єктів з гнійним гідраденітом. Дані представлені у вигляді рівнів експресії гена STAT1, STAT2 або STAT3 для кожного здорового контрольного суб'єкта (n=4) і суб'єкта з гнійним гідраденітом (n=41).

На Фіг. 9 показана експресія генів (MFI) IRAK1, IRAK2, і IRAK4 в шкірі здорових суб'єктів контрольної групи і суб'єктів з гнійним гідраденітом. Дані представлені у вигляді рівнів експресії генів IRAK1, IRAK2 або IRAK4 для кожного здорового контрольного суб'єкта (n=4) і суб'єкта з гнійним гідраденітом (n=41).

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

У цій заявці представлений поміж іншого спосіб лікування гнійного гідраденіту у пацієнта, що потребує цього, який включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки, яка інгібує JAK1 і/або JAK2, або її фармацевтично прийнятної солі.

В описаному в цьому документі методі використовуються сполука або солі, які є інгібіторами JAK1 і/або JAK2. У деяких варіантах реалізації сполука являє собою:

руксолітиніб;

руксолітиніб, в якому один або декілька атомів гідрогену замінені атомами дейтерію;

{1-[1-[3-Фтор-2-(трифторметил)ізонікотиноіл]піперидин-4-іл]-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил;

4-{3-(Ціанометил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]піперидин-1-карбоксамід;

[3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]-1-(1-[2-(трифторметил)піримідин-4-іл]карбоніл]піперидин-4-іл)азетидин-3-іл]ацетонітрил;

4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід;

((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1Н-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2Н-піран-2-іл)ацетонітрил;

3-[1-(6-хлорпіридин-2-іл)піролідин-3-іл]-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропаннітрил;

3-(1-[1,3]оксазоло[5,4-b]піридин-2-іл)піролідин-3-іл)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропаннітрил;

4-[(4-{3-ціано-2-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропіл]піперазин-1-іл)карбоніл]-3-фторбензонітрил;

4-[(4-{3-ціано-2-[3-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-пірол-1-іл]пропіл]піперазин-1-іл)карбоніл]-3-фторбензонітрил;

[транс-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]-3-(4-{[2-(трифторметил)піримідин-4-іл]карбоніл]піперазин-1-іл)циклобутил]ацетонітрил;

{транс-3-(4-{[4-{(3-гідроксіазетидин-1-іл)метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил}ацетонітрил;

{транс-3-(4-{[4-{(2S)-2-(гідроксиметил)піролідин-1-іл]метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-

іл]циклобутил]ацетонітрил;

{транс-3-(4-{[4-{{(2R)-2-(гідроксиметил)піролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил]ацетонітрил;

5 4-(4-{3-[(диметиламіно)метил]-5-фторфенокси}піперидин-1-іл)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]бутаннітрил;

5-{3-(ціанометил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-ізопропілпіразин-2-карбоксамід;

10 4-{3-(ціанометил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід;

5-{3-(ціанометил)-3-[4-(1H-піроло[2,3-b]піридин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-ізопропілпіразин-2-карбоксамід;

{1-(цис-4-{{[6-(2-гідроксіетил)-2-(трифторметил)піримідин-4-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл]ацетонітрил;

15 {1-(цис-4-{{[4-[(етиламіно)метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл]ацетонітрил;

{1-(цис-4-{{[4-(1-гідрокси-1-метилетил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл]ацетонітрил;

20 {1-(цис-4-{{[4-{{(3R)-3-гідроксипіролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл]ацетонітрил;

{1-(цис-4-{{[4-{{(3S)-3-гідроксипіролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл]ацетонітрил;

25 {транс-3-(4-{{[4-{{(1S)-2-гідрокси-1-метилетил]аміно}метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил]ацетонітрил;

{транс-3-(4-{{[4-{{(2R)-2-гідроксипропіл]аміно}метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил]ацетонітрил;

30 {транс-3-(4-{{[4-{{(2S)-2-гідроксипропіл]аміно}метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил]ацетонітрил;

{транс-3-(4-{{[4-(2-гідроксіетил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил]ацетонітрил;

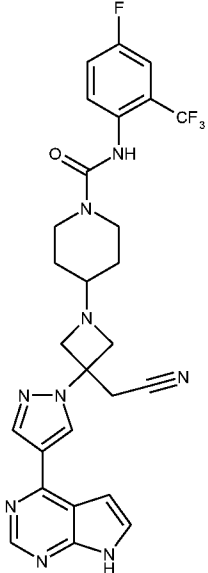
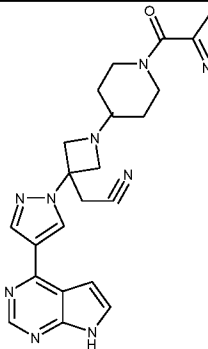
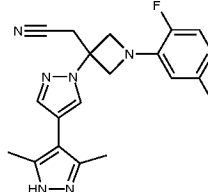
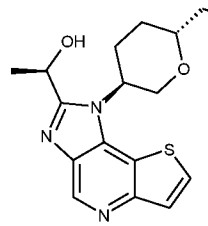
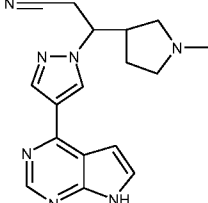
35 або фармацевтично прийнятну сіль будь-якої з перерахованих вище.

У деяких варіантах реалізації сполука або сіль є селективними щодо JAK1 і JAK2 в порівнянні з JAK3 і TYK2. У деяких варіантах реалізації сполука являє собою 3-циклопентил-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]пропаннітрил або його фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації сполука являє собою (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]пропаннітрил (руксолітиніб) або його фармацевтично прийнятну сіль. Руксолітиніб має IC<sub>50</sub> менше 10 нМ при 1мМ АТФ (аналіз А) для JAK1 і JAK2. 3-циклопентил-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]пропаннітрил і руксолітиніб можуть бути отримані за методикою, описаною в US 7598257 (приклад 67), поданому 12 грудня 2006 року, який в повному обсязі включений в цей документ шляхом посилання. У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою фосфатну сіль (3R)-3-циклопентил-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]пропаннітрил. Сіль фосфорної кислоти може бути отримана, як описано в патенті US 8722693, який включений в цей документ у повному обсязі шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації сполука або сіль являє собою інгібітор JAK1. У деяких варіантах реалізації сполука або сіль є селективними щодо JAK1 у порівнянні з JAK2, JAK3 та TYK2. Наприклад, деякі описані в цьому документі сполуки або їх фармацевтично прийнятна сіль переважно інгібують JAK1 в порівнянні з одним або більше з JAK2, JAK3 і TYK2. JAK1 відіграє центральну роль в низці сигнальних шляхів цитокінів і факторів росту, які при порушенні регуляції можуть призводити до хворобливих станів або сприяти їх виникненню. Наприклад, рівень IL-6 підвищений при ревматоїдному артриті, захворюванні, при якому передбачається, що він має згубні наслідки (Fonesca, et al., Autoimmunity Reviews, 8:538-42, 2009). Оскільки IL-6 передає сигнал, принаймні частково, через JAK1, IL-6 може, опосередковано через інгібування JAK1, давати в результаті потенційну клінічну користь (Guschin, et al. Embo J 14:1421, 1995; Smolen, et al. Lancet 371:987, 2008) Більше того, при деяких формах раку JAK1 мутує, що призводить до небажаного росту і виживанню пухлинних клітин (Mullighan, Proc Natl Acad Sci U

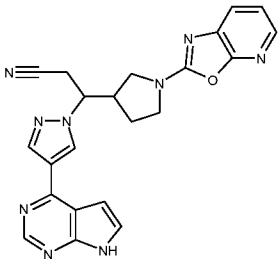
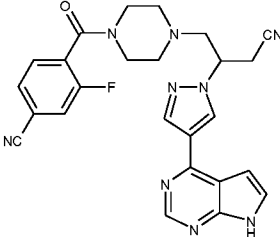
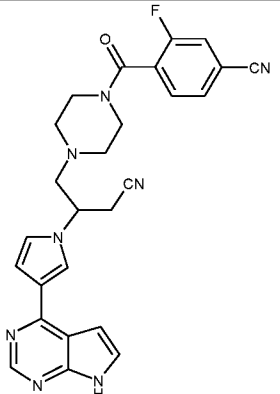
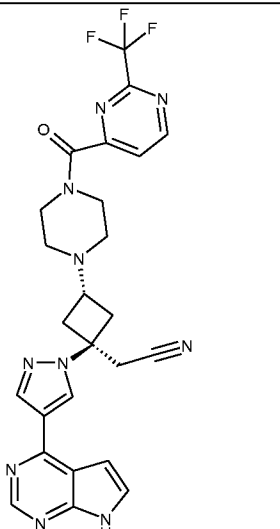


Таблиця 1

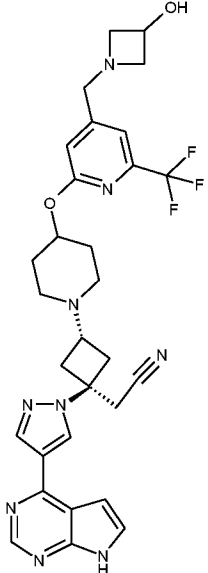
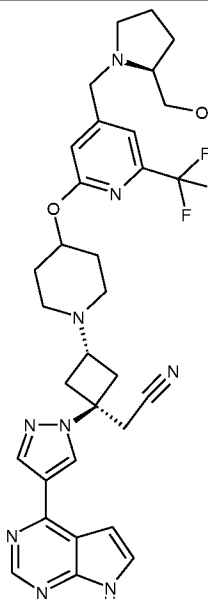
Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
2	US 2011/0224190 (Приклад 154)	4-{3-(Ціанометил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]піперидин-1-карбоксамід		+	>10
3	US 2011/0224190 (Приклад 85)	[3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]-1-(1-{[2-(трифторметил)піримідин-4-іл]карбоніл}піперидин-4-іл)азетидин-3-іл]ацетонітрил		+	>10
4	US 2014/0343030 (Приклад 7)	4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід		+++	>10
5	US 2014/0121198 (Приклад 20)	((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1Н-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2Н-піран-2-іл)ацетонітрил		++	>10
6	US 2010/0298334 (Приклад 2) <sup>a</sup>	3-[1-(6-хлорпіридин-2-іл)піролідин-3-іл]-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропаннітрил		+	>10



Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
7	US 2010/029833 4 (Приклад 13с)	3-(1-[1,3]оксазоло[5,4-b]піридин-2-іл)піролідин-3-іл)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропаннітрил		+	>10
8	US 2011/005995 1 (Приклад 12)	4-[(4-{3-ціано-2-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]пропіл}піперазин-1-іл)карбоніл]-3-фторбензонітрил		+	>10
9	US 2011/005995 1 (Приклад 13)	4-[(4-{3-ціано-2-[3-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-пірол-1-іл]пропіл}піперазин-1-іл)карбоніл]-3-фторбензонітрил		+	>10
10	US 2012/014968 1 (Приклад 7b)	[транс-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]-3-(4-{[2-(трифторметил)піримідин-4-іл]карбоніл}піперазин-1-іл)циклобутил]ацетонітрил		+	>10

Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	JAK1 IC <sub>50</sub> (нМ)	JAK2/JAK1
11	US 2012/014968 1 (Приклад 157)	{транс-3-(4-{[4-[(3-гідроксіазетидин-1-іл)метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10
12	US 2012/014968 1 (Приклад 161)	{транс-3-(4-{[4-[(2S)-2-(гідроксиметил)піролідин-1-іл]метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10

Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
13	US 2012/014968 1 (Приклад 162)	{транс-3-(4-{[4-{{(2R)-2-(гідроксиметил)піролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10
14	US 2012/014968 2 (Приклад 20) <sup>b</sup>	4-(4-{3-[(диметиламіно)метил]-5-фторфенокси}піперидин-1-іл)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]бутаннітрил		+	>10
15	US 2013/001803 4 (Приклад 18)	5-{3-(ціанометил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-ізопропілпіразин-2-карбоксамід		+	>10
16	US 2013/001803 4 (Приклад 28)	4-{3-(ціанометил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід		+	>10
17	US 2013/001803 4 (Приклад 34)	5-{3-(ціанометил)-3-[4-(1H-піроло[2,3-b]піридин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-ізопропілпіразин-2-карбоксамід		+	>10

Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
18	US 2013/004596 3 (Приклад 45)	{1-(цис-4-{[6-(2-гідроксіетил)-2-(трифторметил)піримідин-4-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил		+	>10
19	US 2013/004596 3 (Приклад 65)	{1-(цис-4-{[4-[(етиламіно)метил]-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил		+	>10
20	US 2013/004596 3 (Приклад 69)	{1-(цис-4-{[4-(1-гідрокси-1-метилетил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил		+	>10
21	US 2013/004596 3 (Приклад 95)	{1-(цис-4-{[4-{[(3R)-3-гідроксіпіролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил		+	>10
22	US 2013/004596 3 (Приклад 95)	{1-(цис-4-{[4-{[(3S)-3-гідроксіпіролідин-1-іл]метил}-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}циклогексил)-3-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил		+	>10

Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
23	US 2014/000516 6 (Приклад 1)	{транс-3-(4-{[4-({[(1S)-2-гідрокси-1-метилетил]аміно}метил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10
24	US 2014/000516 6 (Приклад 14)	{транс-3-(4-{[4-({[(2R)-2-гідроксипропіл]аміно}метил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10

Таблиця 1

Спол. №	Преп.	Назва	Структура	ЖАК1 IC <sub>50</sub> (нМ)	ЖАК2/ЖАК1
25	US 2014/000516 6 (Приклад 15)	{транс-3-(4-{[4-({(2S)-2-гідроксипропіл]аміно} метил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10
26	US 2014/000516 6 (Приклад 20)	{транс-3-(4-{[4-(2-гідроксіетил)-6-(трифторметил)піридин-2-іл]окси}піперидин-1-іл)-1-[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]циклобутил} ацетонітрил		+	>10

+ означає <10 нМ (умови аналізу див. у прикладі А)

++ означає ≤ 100 нМ (умови аналізу див. у прикладі А)

+++ означає ≤ 300 нМ (умови аналізу див. у прикладі А)

<sup>а</sup>Дані для енантіомеру 1

<sup>б</sup>Дані для енантіомеру 2

У деяких варіантах реалізації інгібітор ЖАК1 являє собою {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиніол]піперидин-4-іл}-3[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

5 У деяких варіантах реалізації інгібітор ЖАК1 являє собою адипінатну сіль {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиніол]піперидин-4-іл}-3[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрилу.

Синтез і препарат {1-[3-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиноіл]піперидин-4-іл}-3[4-(7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1Н-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрилу і його сіль адипінової кислоти можна знайти, наприклад, в патентній публікації US № 2011/0224190, поданій 9 березня 2011 р., патентній публікації US № 2013/0060026, поданій 6 вересня 2012 р., і патентній публікації US № 2014/0256941, поданій 5 березня 2014 р., кожна з яких включена в повному обсязі в цей документ шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою фосфат 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою гідрохлорид 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою гідробромід 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою сульфат 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.

Синтез і препарат 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід і його сіль фосфорної кислоти можна знайти, наприклад, в US Patent Publ. №. US 2014/0343030, поданій 16 травня 2014 р., вміст якої в повному обсязі включено в цей документ шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1Н-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2Н-піран-2-іл)ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

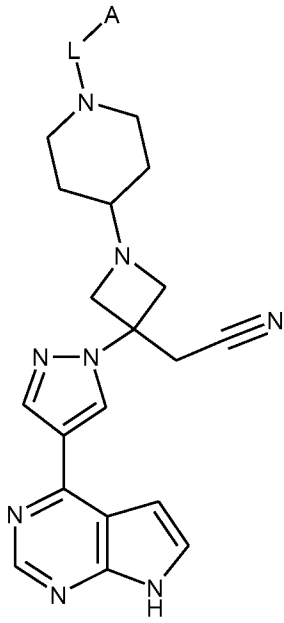
У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1Н-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2Н-піран-2-іл)ацетонітрил моногідрат.

Синтез ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1Н-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2Н-піран-2-іл)ацетонітрилу і характеристика його безводної і моногідратної форм описані в US Patent Publ. № 2014/0121198, поданій 31 жовтня 2013 року, і US Patent Publ. № 2015/0344497, поданій 29 квітня 2015 року, кожна з яких в повному обсязі включена в цей документ шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації сполуки Таблиці 1 отримують синтетичними способами, описаними в US Patent Publ. № 2011/0224190, поданій 9 березня 2011 р., патентній публікації US № 2014/0343030, поданій 16 травня 2014 р., патентній публікації US № 2014/0121198, поданій 31 жовтня 2013 р., патентній публікації US № 2010/0298334, поданій 21 травня 2010 р., патентній публікації US № 2011/0059951, поданій 31 серпня 2010 р., патентній публікації US № 2012/0149681, поданій 18 листопада 2011 р., патентній публікації US № 2012/0149682, поданій 18 листопада 2011 р., патентній публікації US 2013/0018034, поданій 19 червня 2012 р., патентній публікації US № 2013/0045963, поданій 17 серпня 2012 р., і патентній публікації US № 2014/0005166, поданій 17 травня 2013 р., кожна з яких у повному обсязі включена в цей документ шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 обраний зі сполук або їх фармацевтично прийнятних солей, зазначених у US Patent Publ. № 2011/0224190, поданій 9 березня 2011 р., патентній публікації US № 2014/0343030, поданій 16 травня 2014 р., патентній публікації US № 2014/0121198, поданій 31 жовтня 2013 р., патентній публікації US № 2010/0298334, поданій 21 травня 2010 р., патентній публікації US № 2011/0059951, поданій 31 серпня 2010 р., патентній публікації US № 2012/0149681, поданій 18 листопада 2011 р., патентній публікації US № 2012/0149682, поданій 18 листопада 2011 р., патентній публікації US 2013/0018034, поданій 19 червня 2012 р., патентній публікації US № 2013/0045963, поданій 17 серпня 2012 р., і патентній публікації US № 2014/0005166, поданій 17 травня 2013 р., кожна з яких у повному обсязі включена в цей документ шляхом посилання.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою сполуку Формули I



I

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

X являє собою N або CH;

L являє собою C(=O) або C(=O)NH;

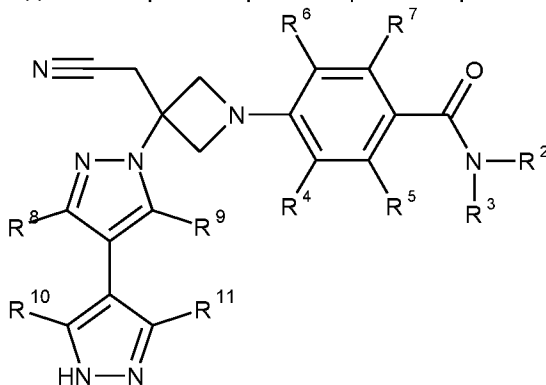
- 5 А являє собою феніл, піридиніл або піримідиніл, кожен з яких необов'язково заміщений 1 або 2 незалежно вибраними R<sup>1</sup> групами; а також кожен R<sup>1</sup> являє собою фтор або трифторметил.

У деяких варіантах реалізації сполука Формули I являє собою {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)ізонікотиноіл]піперидин-4-іл}-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

10 У деяких варіантах реалізації сполука Формули I являє собою 4-{3-(ціанометил)-3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]азетидин-1-іл}-N-[4-фтор-2-(трифторметил)феніл]піперидин-1-карбоксамід або його фармацевтично прийнятну сіль.

15 У деяких варіантах реалізації сполука Формули I являє собою [3-[4-(7H-піроло[2,3-d]піримідин-4-іл)-1H-піразол-1-іл]-1-(1-{2-(трифторметил)піримідин-4-іл}карбоніл)піперидин-4-іл]азетидин-3-іл}ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою сполуку Формули II



II

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

- 20 R<sup>2</sup> являє собою C<sub>1-6</sub> алкіл, C<sub>1-6</sub> галогеналкіл, C<sub>3-6</sub> циклоалкіл або C<sub>3-6</sub> циклоалкіл-C<sub>1-3</sub> алкіл, де зазначений C<sub>1-6</sub> алкіл, C<sub>3-6</sub> циклоалкіл і C<sub>3-6</sub> циклоалкіл-C<sub>1-3</sub> алкіл, кожен, необов'язково заміщений 1, 2 або 3 замісниками, незалежно вибраними з фтору, -CF<sub>3</sub> і метилу;

R<sup>3</sup> являє собою H або метил;

R<sup>4</sup> являє собою H, F або Cl;

- 25 R<sup>5</sup> являє собою H або F;

R<sup>6</sup> являє собою H або F;

R<sup>7</sup> являє собою H або F;

R<sup>8</sup> являє собою H або метил;

R<sup>9</sup> являє собою H або метил;

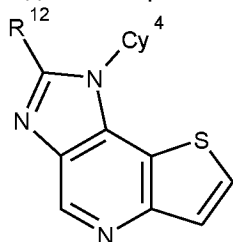


R<sup>10</sup> являє собою H або метил; i

R<sup>11</sup> являє собою H або метил.

У деяких варіантах реалізації сполука Формули II являє собою 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1H, 1'H-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 являє собою сполуку Формули III



III

або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

Cy<sup>4</sup> являє собою тетрагідро-2H-піранове кільце, яке необов'язково заміщене 1 або 2 групами, незалежно вибраними з CN, OH, F, Cl, C<sub>1-3</sub> алкілу, C<sub>1-3</sub> галогеналкілу, CN-C<sub>1-3</sub> алкілу, HO-C<sub>1-3</sub> алкілу, аміно, C<sub>1-3</sub> алкіламіно і ди (C<sub>1-3</sub>залкіл)аміно, де зазначений C<sub>1-3</sub>залкіл і ди(C<sub>1-3</sub>залкіл)аміно необов'язково заміщений 1, 2 або 3 замісниками, незалежно вибраними з F, Cl, C<sub>1-3</sub> алкіламіносальфонілу і C<sub>1-3</sub>залкілсульфонілу; i

R<sup>12</sup> являє собою -CH<sub>2</sub>-OH, -CH(CH<sub>3</sub>)-OH, або -CH<sub>2</sub>-NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

У деяких варіантах реалізації сполука Формули III являє собою ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1H-імідазо[4,5-d]піридин-1-іл}тетрагідро-2H-піран-2-іл)ацетонітрил або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою барцитиніб, тофацитиніб, оклацитиніб, філготиніб, гандотиніб, лестуртиніб, момелотиніб, бакритиніб, PF-04965842, упадацитиніб, пецитиніб, федбітацин, кукуртиніб (ATI-501), кукуртиніб (ATI)-502 (Aclaris), JTE052 (Leo Pharma и Japan Tobacco) або CHZ868.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 може бути ізотопно-міченою сполукою або її фармацевтично прийнятною сіллю. "Ізотопно" або "радіоактивно мічена" сполука являє собою сполуку згідно розкриттю, в якій один або більше атомів замінені або заміщені атомом, що має атомну масу або масове число, відмінні від атомної маси або масового числа, які зазвичай можна виявити в природі (тобто зустрічаються в природі). Відповідні радіонукліди, які можуть бути включені в сполуки цього розкриття, включають, але не обмежуються ними, <sup>2</sup>H (також позначається як D для дейтерію), <sup>3</sup>H (також позначається як T для тритію), <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>18</sup>F, <sup>35</sup>S, <sup>36</sup>Cl, <sup>82</sup>Br, <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I і <sup>131</sup>I. Наприклад, один або більше атомів водню в сполуці за цим розкриттям можуть бути замінені атомами дейтерію, наприклад, -CD<sub>3</sub>замінений на -CH<sub>3</sub>).

Одна або більше складових атомів описаних в даному документі сполук можуть бути замінені або заміщені ізотопами атомів природної або неприродної частоти. У деяких варіантах реалізації сполука включає щонайменше один атом дейтерію. У деяких варіантах реалізації сполука включає два або більше атомів дейтерію. У деяких варіантах реалізації сполука включає 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 або 1-6 атомів дейтерію. У деяких варіантах реалізації всі атоми гідрогену в сполуці можуть бути замінені або заміщені атомами дейтерію.

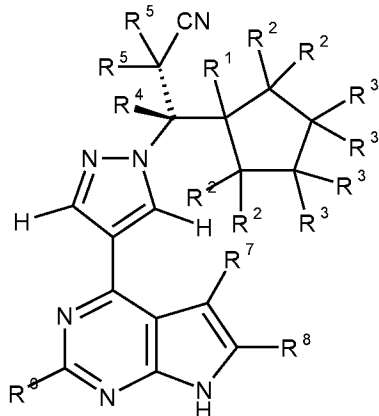
Синтетичні методи включення ізотопів в органічні сполуки відомі в цій області техніки (Deuterium Labeling in Organic Chemistry by Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange by Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labelling by James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). Мічені ізотопами сполуки можуть використовуватися в різних дослідженнях, як-от ЯМР-спектроскопія, експерименти з метаболізму та/або аналізи.

Заміна важкими ізотопами, як-от дейтерій, може дати певні терапевтичні переваги, обумовлені більшою метаболічною стабільністю, наприклад, збільшеним in vivo періодом напіврозпаду або зменшеними вимогами до дозування, і, отже, може бути переважною в деяких обставинах. (див., наприклад, A. Kerekes et. al. J. Med. Chem. 2011, 54, 201-210; R. Xu et. al. J. Label Compd. Radiopharm. 2015, 58, 308-312). Зокрема, заміна в одній або більше ділянках метаболізму може дати одну або більше терапевтичних переваг.

Відповідно, в деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою сполуку, в якій один або більше атомів водню в сполуці замінені атомами дейтерію, або її фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою руксолітиніб, в якому один або декілька атомів гідрогену замінені атомами дейтерію, або його фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою будь-яку зі сполук в патенті США 9249149 (який повністю включений в цей документ шляхом посилання) або її фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою СТР-543 або його фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах реалізації сполука являє собою сполуку формули I:



або її фармацевтично прийнятну сіль, де:

10 R<sup>1</sup> вибраний з Н і D.

кожен R<sup>2</sup> незалежно вибраний з Н і D, за умови, що кожен R<sup>2</sup>, приєднаний до спільного карбону, є одним і тим самим.

кожен R<sup>3</sup> незалежно вибраний з Н і D, за умови, що кожен R<sup>3</sup>, приєднаний до спільного карбону, є одним і тим самим.

15 R<sup>4</sup> вибраний з Н і D.

кожен R<sup>5</sup> є одним і тим самим і вибраний з Н і D,

R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, і R<sup>8</sup> кожен незалежно вибраний з Н і D; за умови, що коли R<sup>1</sup> являє собою Н, кожен R<sup>2</sup> і кожен R<sup>3</sup> являють собою Н, R<sup>4</sup> являє собою Н і кожен з R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, і R<sup>8</sup> являє собою Н, тоді кожен R<sup>5</sup> являє собою D.

20 У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою сполуку Формули I, вибрану з наведених сполук 100-130 в таблиці нижче (де R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> і R<sup>8</sup> являє собою, кожен, Н) або її фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою сполуку Формули I, вибрану з наведених сполук 200-231 в таблиці нижче (де R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> і R<sup>8</sup> являє собою, кожен, D) або її фармацевтично прийнятну сіль.

25

Сполука	R <sup>1</sup>	Кожен R <sup>2</sup>	Кожен R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Кожен R <sup>5</sup>
100	H	H	H	D	H
101	H	H	H	H	D
102	H	H	H	D	D
103	H	H	D	H	H
104	H	H	D	D	H
105	H	H	D	H	D
106	H	H	D	D	D
107	H	D	H	H	H
108	H	D	H	D	H
109	H	D	H	H	D
110	H	D	H	D	D
111	H	D	D	H	H
112	H	D	D	D	H
113	H	D	D	H	D
114	H	D	D	D	D
115	D	H	H	H	H
116	D	H	H	D	H
117	D	H	H	H	D
118	D	H	H	D	D
119	D	H	D	H	H

120	D	H	D	D	H
121	D	H	D	H	D
122	D	H	D	D	D
123	D	D	H	H	H
124	D	D	H	D	H
125	D	D	H	H	D
126	D	D	H	D	D
127	D	D	D	H	H
128	D	D	D	D	H
129	D	D	D	H	D
130	D	D	D	D	D
200	H	H	H	D	H
201	H	H	H	H	D
202	H	H	H	D	D
203	H	H	D	H	H
204	H	H	D	D	H
205	H	H	D	H	D
206	H	H	D	D	D
207	H	D	H	H	H
208	H	D	H	D	H
209	H	D	H	H	D
210	H	D	H	D	D
211	H	D	D	H	H
212	H	D	D	D	H
213	H	D	D	H	D
214	H	D	D	D	D
215	D	H	H	H	H
216	D	H	H	D	H
217	D	H	H	H	D
218	D	H	H	D	D
219	D	H	D	H	H
220	D	H	D	D	H
221	D	H	D	H	D
222	D	H	D	D	D
223	D	D	H	H	H
224	D	D	H	D	H
225	D	D	H	H	D
226	D	D	H	D	D
227	D	D	D	H	H
228	D	D	D	D	H
229	D	D	D	H	D
230	D	D	D	D	D
231	H	H	H	H	H

У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою барицитиніб, в якому один або більше атомів гідрогену замінені атомами дейтерію, або його фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації інгібітор JAK1 і/або JAK2 являє собою будь-яку зі сполук в патенті США 9540367 (який повністю включений в цей документ шляхом посилання) або її фармацевтично прийнятну сіль.

Як використано в цьому описі, фраза "необов'язково заміщений" означає незаміщений або заміщений. Як використано в цьому описі, термін "заміщений" означає, що атом гідрогену вилучений і замінений замісником. Слід розуміти, що заміщення у цього атома обмежене валентністю.

У контексті цього документа термін " $C_{n-m}$  алкіл", використаний окремо або в поєднанні з іншими термінами, стосується насиченої вуглеводневої групи, яка може бути лінійною або розгалуженою, яка має від  $n$  до  $m$  атомів карбону. У деяких варіантах реалізації алкільна група містить від 1 до 6 або від 1 до 3 атомів карбону. Приклади алкільних фрагментів включають, але не обмежуються ними, хімічні групи, як-от метильна, етильна,  $n$ -пропільна, ізопропільна,  $n$ -

бутильна, ізобутильна, втор-бутильна, трет-бутильна, н-пентильна, 2-метил-1-бутильна, 3-пентильна, н-гексильна, 1,2,2-триметилпропільна тощо.

Як використано в цьому описі, термін "алкілен", який використовується окремо або в поєднанні з іншими термінами, стосується двовалентної алкільної зв'язуючої групи, яка може бути розгалуженою або лінійною, де два замісники можуть бути приєднані в будь-якому положенні алкіленової зв'язуючої групи. Приклади алкіленових груп включають, але не обмежуються ними, етан-1,2-диіл, пропан-1,3-диіл, пропан-1,2-диіл тощо.

Як використано в цьому описі, термін "НО-С<sub>1-3</sub>-алкіл" стосується групи формули -алкілен-ОН, в якій зазначена алкіленова група має від 1 до 3 атомів карбону.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>1-3</sub>-алкіл" стосується С<sub>1-3</sub> алкілу, заміщеного ціаногрупою.

Як використано в цьому описі, термін "аміно" стосується групи формули -NH<sub>2</sub>.

Як використано в цьому описі, термін "ди(С<sub>1-3</sub>-алкіл)аміно" стосується групи формули -N(алкіл)<sub>2</sub>, в якій дві алкільні групи кожна має, незалежно, від 1 до 3 атомів карбону

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>1-3</sub>-алкіламіно" стосується групи формули -NH(алкіл), в якій алкільна група має від 1 до 3 атомів карбону.

Як використано в цьому описі, термін "ди(С<sub>1-3</sub>-алкіл)аміносольфоніл" стосується групи формули -S(O)<sub>2</sub>N(алкіл)<sub>2</sub>, де кожна алкільна група незалежно має від 1 до 3 атомів карбону.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>1-3</sub>-алкілсульфоніл" стосується групи формули -S(O)<sub>2</sub>-алкіл, де алкільна група має від 1 до 3 атомів карбону.

Як використано в цьому описі, "гало" або "галоген", використовувані окремо або в комбінації з іншими термінами, включають фтор, хлор, бром і йод. У деяких варіантах реалізації група галогену являє собою фтор або хлор.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>n-m</sub>-галогеналкіл", що використовується окремо або в комбінації з іншими термінами, стосується С<sub>n-m</sub> алкільної групи, що має до {2 (від n до m) +1} атомів галогену, які можуть бути однакові або різні. У деяких варіантах реалізації атоми галогену являють собою атоми фтору. У деяких варіантах реалізації алкільна група має від 1-6 або 1-3 атомів вуглецю. Приклади галогеналкільних груп включають CF<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, CHF<sub>2</sub>, CCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>Cl<sub>5</sub> тощо. У деяких варіантах реалізації галогеналкільна група являє собою фторалкільну групу.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>1-3</sub>-фторалкіл" стосується С<sub>1-3</sub> алкільної групи, яка може бути частково або повністю заміщена атомами фтору.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>3-6</sub>-циклоалкіл", який використовується окремо або в поєднанні з іншими термінами, відноситься до неароматичної моноциклічної вуглеводневої групи, що має 3-6 атомів карбону, яка може необов'язково містити одну або декілька алкеніленових груп як частину кільцевої структури. Один або більше утворюючих кільце атомів карбону циклоалкільної групи можуть бути окислені з утворенням карбонільних зв'язків. Типові С<sub>3-6</sub> циклоалкільні групи включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклопентеніл, циклогексеніл, циклогексадієніл тощо. У деяких варіантах реалізації циклоалкільна група являє собою циклопропіл, циклобутил, циклопентил або циклогексил.

Як використано в цьому описі, термін "С<sub>3-6</sub>-циклоалкіл-С<sub>1-3</sub>-алкіл" відноситься до групи формули -С<sub>1-3</sub>-алкілен-С<sub>3-6</sub>-циклоалкіл.

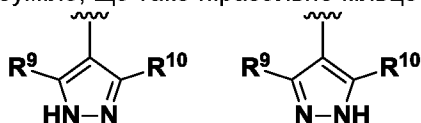
Описані в цьому документі сполуки можуть бути асиметричними (наприклад, мати один або декілька стереоцентрів). Всі стереоізмери, як-от енантіомери та діастереомери, призначені для використання, якщо не вказано інше. Сполуки, які містять асиметрично заміщені атоми карбону, можуть бути виділені в оптично активній або рацемічній формах. Способи отримання оптично активних форм, виготовлених з оптично неактивних вихідних матеріалів, відомі в цій області, як-от розділення рацемічних сумішей або стереоселективний синтез. Багато геометричних ізомерів олефінів, подвійних зв'язків С=N тощо також можуть бути присутніми в сполуках, описаних в цьому документі, і всі такі стабільні ізомери розглядаються в цій заявці. Цис і транс геометричні ізомери сполук за цією заявою описані і можуть бути виділені як суміш ізомерів або як окремі ізомерні форми В деяких варіантах реалізації сполука має (R)-конфігурації. У деяких варіантах реалізації сполука має (S)-конфігурацію.

Розділення рацемічних сумішей сполук можна проводити будь-яким з численних методів, відомих в цій області техніки. Типовий метод включає фракційну перекристалізацію з використанням хіральної розділяючої кислоти, яка є оптично активною солеутворюючою органічною кислотою. Придатними розділяючими агентами для методів фракційної перекристалізації є, наприклад, оптично активні кислоти, як-от D- і L-форми винної кислоти, діацетилвинної кислоти, дибензоілвинної кислоти, мигдальної кислоти, яблучної кислоти, молочної кислоти або різні оптично активні камфорсульфонові кислоти, як-от β-

камфорсульфонова кислота. Інші розділяючі агенти, придатні для методів фракційної кристалізації, включають стереоізомерно чисті форми  $\alpha$ -метилбензиламіну (наприклад, S і R форми або діастереомерно чисті форми), 2-фенілгліцин, норефедрин, ефедрин, N-метилефедрин, циклогексилетиламін, 1,2-діаміноциклогексан тощо.

5 Розділення рацемічних сумішей також можна проводити елюванням на колонці, заповненій оптично активним розділяючим агентом (наприклад, динітробензоілфенілгліцином). Придатний склад розчинника для елювання може визначити фахівець у цій галузі техніки.

10 Сполуки, описані в цьому документі, включають таутомерні форми. Таутомерні форми виникають в результаті обміну одинарного зв'язку з сусіднім подвійним зв'язком разом з супутньою міграцією протону. Таутомерні форми включають прототропні таутомери, які являють собою ізомерні стани протонування, що мають одну і ту ж емпіричну формулу і сумарний заряд. Приклади прототропних таутомерів включають пари кетон-енол, пари амід-імідна кислота, пари лактам-лактим, пари енамін-імін і кільцеві форми, де протон може займати 15 два або більше положень гетероциклічної системи, наприклад, 1H- і 3H- імідазол, 1H-, 2H- і 4H- 1,2,4-тріазол, 1H- і 2H-ізоіндол і 1H- і 2H-піразол. Таутомерні форми можуть бути в рівновазі або стерично заблокованими в одну форму шляхом відповідного заміщення. Наприклад, буде зрозуміло, що таке піразольне кільце може утворювати два таутомери:



Передбачається, що формула винаходу поширюється на обидва таутомери.

20 Всі сполуки та їх фармацевтично прийнятні солі можуть бути виявлені разом з іншими речовинами, як-от вода та розчинники (наприклад, гідрати і сольвати), або можуть бути виділені

У деяких варіантах реалізації сполуки, описані в цьому документі, або їх солі є по суті ізольованими. Під "по суті ізольованою" мається на увазі, що сполука, щонайменше, частково або в значній мірі відокремлена від навколишнього середовища, в якій вона було утворена або 25 виявлена. Часткове розділення може включати, наприклад, композицію, збагачену описаними в цьому документі сполуками. Суттєве розділення може включати композиції, що містять щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 60 %, щонайменше близько 70 %, щонайменше близько 80 %, щонайменше близько 90 %, щонайменше близько 95 %, щонайменше близько 97 % або щонайменше близько 99 % за масою сполук, описаних в цьому 30 документі, або їх солі. Способи виділення сполук та їх солей являють собою загальновідомі в цій області техніки

Фраза "фармацевтично прийнятний" використовується в цьому документі для позначення тих сполук, матеріалів, композицій та/або лікарських форм, які, в рамках раціонального медичного судження, придатні для використання в контакт з тканинами людей і тварин без 35 надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або іншої проблеми або ускладнення, пропорційних розумному співвідношенню користі/ризиків.

Вирази "температура навколишнього середовища" та "кімнатна температура" або "кт", як використано в цьому описі, зрозумілі в цій області техніки та зазвичай стосуються температури, наприклад, температури реакції, яка приблизно дорівнює температурі приміщення, в якому 40 проводять реакцію, наприклад від близько 20 °C до близько 30 °C.

Ця заявка також включає фармацевтично прийнятні солі описаних в цьому документі сполук. Як використано в цьому описі, термін "фармацевтично прийнятні солі" стосується похідних описаних сполук, в яких вихідну сполуку модифікували шляхом перетворення існуючого кислотного або основного фрагмента в його сольову форму. Приклади 45 фармацевтично прийнятних солей включають, але не обмежуються ними, солі мінеральних або органічних кислот основних залишків, як-от аміни; солі основних катіонів і органічні солі кислотних залишків, як-от карбонові кислоти; тощо. Фармацевтично прийнятні солі за цією заявкою включають звичайні нетоксичні солі вихідної сполуки, утворені, наприклад, з нетоксичних неорганічних або органічних кислот. Фармацевтично прийнятні солі за цією 50 заявкою можуть бути синтезовані з вихідної сполуки, яка містить основну або кислотну складову, звичайними хімічними методами. Зазвичай такі солі можуть бути отримані взаємодією вільних кислотних або основних форм цих сполук зі стехіометричною кількістю відповідної основи або кислоти у воді або в органічному розчиннику, або в суміші обох; як правило, переважними є неводні середовища, як-от етер, етилацетат, спирти, (наприклад, метанол, етанол, ізопропанол або бутанол) або ацетонітрил (ACN). Списки відповідних солей можна 55 знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418 і Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), кожна з яких повністю включена в

цей документ шляхом посилання.

Як використано в цьому описі, термін "контактування" стосується об'єднання зазначених фрагментів у *in vitro* системі або у *in vivo* системі. Наприклад, "контактування" JAK зі сполукою за цим винаходом включає введення сполуки за цією заявкою індивіду або пацієнту, наприклад

5

людині, яка має JAK, а також, наприклад, введення сполуки за винаходом у зразок, що містить клітинний або очищений препарат, який містить JAK.

Як використано в цьому описі, терміни "суб'єкт", "індивід" або "пацієнт", використовувані як

10

взаємозамінні, стосуються будь-якої тварини, зокрема, ссавців, переважно мишей, пацюків, інших гризунів, кроликів, собак, котів, свиней, великої рогатої худоби, вівці, коней або приматів

та найпереважніше людей. У деяких варіантах реалізації "суб'єкт", "індивід" або "пацієнт" потребує зазначеного лікування.

У деяких варіантах реалізації інгібітори вводять в терапевтично ефективній кількості. Як використано в цьому описі, фраза "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості активної сполуки або фармацевтичного агента, яка викликає біологічну або медичну відповідь, яка потребується в тканині, системі, тварині, індивіді або людині досліднику, ветеринару, сімейному лікарю або іншому клініцисту.

15

Як використано в цьому описі, термін "лікування" або "терапія" стосується одного або більше з (1) пригнічення захворювання; наприклад, пригнічення захворювання, стану або розладу у індивідуума, який відчуває або демонструє патологію або симптоматику захворювання, стану або розладу (тобто зупинку подальшого розвитку патології і/або симптоматики); (2) полегшення хвороби; наприклад, полегшення захворювання, стану або розладу у індивідуума, який відчуває або демонструє патологію або симптоматику захворювання, стану або розладу (тобто реверсію патології і/або симптоматології), як-от зменшення тяжкості захворювання; або (3) запобігання захворюванню, стану або розладу у людини, яка може бути схильна до захворювання, стану або розладу, але ще не відчуває або не проявляє патологію або симптоматику захворювання. У деяких варіантах реалізації лікування стосується пригнічення або полегшення захворювання. У деяких варіантах реалізації лікування являє собою запобігання захворюванню.

20

25

Комбіновані способи лікування

30

Описані в цьому документі способи можуть додатково включати введення одного або декількох додаткових терапевтичних агентів. Один або декілька додаткових терапевтичних агентів можна вводити пацієнтові одночасно або послідовно.

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою антибіотик. У деяких варіантах реалізації винаходу антибіотик являє собою кліндаміцин, доксициклін, міноциклін, триметоприм-сульфаметоксазол, еритроміцин, метронідазол, рифампін, моксифлоксацин, дапсон або їх комбінацію. У деяких варіантах реалізації антибіотик являє собою кліндаміцин, доксициклін, міноциклін, триметоприм-сульфаметоксазол або еритроміцин в комбінації з метронідазолом. У деяких варіантах реалізації антибіотик являє собою комбінацію рифампіну, моксифлоксацину і метронідазолу. У деяких варіантах реалізації антибіотик являє собою комбінацію моксифлоксацину і рифампіну.

35

40

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою ретиноїд. У деяких варіантах реалізації ретиноїд являє собою етретинат, ацитретин або ізотретіноїн.

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою стероїд. У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою кортикостероїд. У деяких варіантах реалізації стероїд являє собою триамцинолон, дексаметазон, флуоцинолон, кортизон, преднізон, преднізолон або флуметолон.

45

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний засіб являє собою засіб проти TNF-альфа. У деяких варіантах реалізації засіб проти TNF-альфа являє собою антитіло проти TNF-альфа. У деяких варіантах реалізації засіб проти TNF-альфа являє собою інфліксімаб, або етанерцепт, або адаліумаб.

50

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою імунодепресант. У деяких варіантах реалізації імунодепресант являє собою метотрексат або циклоспорин А. У деяких варіантах реалізації імунодепресант являє собою мікофенолятмофетил або мікофенолят натрію.

55

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою фінастерид, метформін, адапален або азелаїнову кислоту.

У деяких варіантах реалізації спосіб додатково включає введення додаткового терапевтичного агента, вибраного з IMiDs, агента проти IL-6, агента гіпометилювання і модифікатора біологічної відповіді (BRM - англ.: biologic response modifier).

60

Як правило, BRM - це речовини, отримані з живих організмів для лікування захворювань, які

можуть виникати в організмі природним чином або можуть бути отримані в лабораторії. Приклади BRM включають IL-2, інтерферон, різні типи колонієстимулюючих факторів (КСФ (CSF), ГМКСФ (GM-CSF), Г-КСФ (G-CSF)), моноклональні антитіла, як-от абциксимаб, етанерцепт, інфліксимаб, ритуксимаб, трастурзумаб і високі дози аскорбату.

5 У деяких варіантах реалізації агент гіпометилування являє собою інгібітор ДНК-метилтрансферази. У деяких варіантах реалізації інгібітор ДНК-метилтрансферази вибраний з 5-азацитидину і децитабіну.

Як правило, IMiD являє собою імуномодулюючий засіб. У деяких варіантах реалізації IMiD вибраний з талідоміду, леналідоміду, помалідоміду, CC-11006 і CC-10015.

10 У деяких варіантах реалізації спосіб додатково включає введення додаткового терапевтичного засобу, вибраного з антитимоцитарного глобуліну, рекомбінантного людського гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора (G CSF), гранулоцитарно-моноцитарного CSF (GM-CSF), засобу, що стимулює еритропоез (ESA-erythropoiesis-stimulating agent) і циклоспорину.

15 У деяких варіантах реалізації спосіб додатково включає введення пацієнту додаткового інгібітору JAK. У деяких варіантах реалізації додатковий інгібітор JAK являє собою барцитиніб, тофацитиніб, оклацитиніб, філготиніб, гандотиніб, лестуртиніб, момелотиніб, бакритиніб, PF-04965842, упадацитиніб, пецитиніб, федратиніб, кукурбітацин I або CHZ868.

20 Один або більше додаткових фармацевтичних агентів, як-от, наприклад, протизапальні агенти, імунодепресанти, а також інгібітори кіназ PI3Kδ, mTor, Bcr-Abl, Flt-3, RAF і FAK, як-от, наприклад, описані в WO 2006/056399, який повністю включений в цей документ шляхом посилання, або інші агенти можуть використовуватися в комбінації зі сполуками, описаними в цьому документі, для лікування JAK-асоційованих захворювань, порушень або станів. Один або більше додаткових фармацевтичних агентів можна вводити пацієнтові одночасно або послідовно.

25 Приклади інгібіторів Bcr-Abl включають сполуки і їх фармацевтично прийнятні солі родів і видів, розкритих в патентах US Pat. No. 5521184, WO 04/005281 і U.S. Ser. No. 60/578491, всі з яких повністю включені в цей документ шляхом посилання.

30 Приклади відповідних інгібіторів Flt-3 включають сполуки і їх фармацевтично прийнятні солі, як описано в WO 03/037347, WO 03/099771 і WO 04/046120, всі з яких повністю включені в цей документ за допомогою посилання.

Приклади відповідних інгібіторів RAF включають сполуки і їх фармацевтично прийнятні солі, як описано в WO 00/09495 і WO 05/028444, обидва з яких повністю включені в цей документ шляхом посилання.

35 Приклади відповідних інгібіторів FAK включають сполуки і їх фармацевтично прийнятні солі, як описано в WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 і WO 01/014402, всі з яких повністю включені в цей документ шляхом посилання.

40 У деяких варіантах реалізації одну або більше сполук за цим винаходом можна використовувати в комбінації з одним або більше іншими інгібіторами кінази, включаючи іматиніб, зокрема, для лікування пацієнтів, резистентних до іматинібу або інших інгібіторів кінази.

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою ацетонід флуоцинолону (Retisert®) або римексолон (AL-2178, Vexol, Alcon).

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою циклоспорин (Restasis®).

45 У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент вибраний з Dehydrex™ (Holles Labs), Civamide (Opko), гіалуронату натрію (Vismed, Lantibio/TRB Chemedica), циклоспорину (ST-603, Sirion Therapeutics), ARG101 (Т) (тестостерон, Argentis), AGR1012 (P) (Argentis), екабету натрію (Senju-Ista), гефарнату (Santen), 15-(s)-гідроксиейкозатетраєнової кислоти (15(S)-HETE), севілеміну, доксицикліну (ALTY-0501, Alacrity), міноцикліну, iDestrin™ (NP50301, Nascent Pharmaceuticals), циклоспорину А (Nova22007, Novagali), окситетрацикліну (дураміцин, MOLI1901, Lantibio), CF101 (2S, 3S, 4R, 5R)-3,4-дигідрокси-3,4-дигідрокси-5-[6-[(3-йодфеніл)метиламіно]пурин-9-іл]-N-метилоксолан-2-карбаміл, Can-Fite Biopharma), воклоспорину (LX212 або LX214, Lux Biosciences), ARG103 (Agentis), RX-10045 (синтетичний аналог резольвіну, Resolvux), DYN15 (Dyanmis Therapeutics), ривоглітазону (DE011, Daiichi Sanko), TB4 (RegeneRx), OPH-01 (Opthalmis Monaco), PCS101 (Pericor Science), REV1-31 (Evolutec), лакритину (Сенджу), ребаміпіду (Otsuka-Novart), OT-551 (Othera), PAI-2 (Університет Пенсільванії і Університет Темпл), пілокарпіну, такролімусу, пімекролімусу (AMS981, Novartis), лотепреднолу етабонату, ритуксимабу, тетранатрій диквафозолу (INS365, Inspire), KLS-0611 (Kissei Pharmaceuticals), дегідроєпіандростерону, анакінру, ефалізумабу, мікофенолату натрію, етанерцепту (Embrel®), гідроксихлорохіну, NGX267 (TorreyPines Therapeutics), актемру,

60

гемцитабіну, оксалиплатину, L-аспарагінази або талідоміду.

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою антиангіогенний агент, холінергічний агоніст, модулятор рецептора TRP-1, блокатор кальцієвих каналів, підсилювач секреції муцину, стимулятор MUC1, інгібітор кальциневрину, кортикостероїд, агоніст рецептора P2Y2, мускариновий агоніст рецептора, інгібітор mTOR, інший інгібітор JAK, інгібітор кінази Vcr-Abl, інгібітор кінази Flt-3, інгібітор кінази RAF і інгібітор кінази FAK, як-от, наприклад, описані в WO 2006/056399, який включено в повному обсязі в цей документ шляхом посилання. У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою похідне тетрацикліну (наприклад, міноциклін або доксиклін). У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент зв'язується з FKBP12.

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент являє собою алкілюючий агент або зшиваючий ДНК агент; антиметаболітний/деметилуючий агент (наприклад, 5-флуороурацил, капецитабін або азацитидин); антигормональну терапію (наприклад, антагоністи рецепторів гормонів, SERM або інгібітор ароматази); мітотичний інгібітор (наприклад, вінкристин або паклітаксел); інгібітор топоізомерази (I або II) (наприклад, мітоксантрон і іринотекан); індуктори апоптозу (наприклад, АВТ-737); терапію нуклеїновою кислотою (наприклад, антисенсова або РНКі); ліганди ядерних рецепторів (наприклад, агоністи і/або антагоністи: повністю транс-ретиноєва кислота або бексаротен); агенти епігенетичного націлювання, як-от інгібітори гістондеацетилазу (наприклад, вориностат), гіпометилуючі агенти (наприклад, децитабін); регулятори стабільності білка, як-от інгібітори Hsp90, убіквітин і/або убіквітин подібні кон'югуючі або декон'югуючі молекули; або інгібітор EGFR (ерлотиніб).

У деяких варіантах реалізації додатковий терапевтичний агент включає антибіотик, противірусний, протигрибковий, анестезуючий, протизапальний засіб, включаючи стероїдні і нестероїдні протизапальні засоби, і протиалергічні засоби. Приклади відповідних лікарських засобів включають аміноглікозиди, як-от амікацин, гентаміцин, тобраміцин, стрептоміцин, нетилміцин і канаміцин; фторхінолони, як-от ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин та еноксацин; нафтиридин; сульфонаміди; поліміксин; хлорамфенікол; неоміцин; парамоміцин; колістиметат; бацитрацин; ванкоміцин; тетрациклін; рифампін і його похідні ("рифампіни"); циклосерин; бета-лактами; цефалоспорици; амфотеріцини; флуконазол; флуцитозин; натаміцин; міконазол; кетоконазол; кортикостероїди; диклофенак; флурбіпрофен; кеторолак; супрофен; кромолін; лодоксамід; левокабастин; нафазолін; антазолін; фенірамін; або азалідний антибіотик.

Фармацевтичні композиції і лікарські форми

При використанні в якості фармацевтичних препаратів сполуки за винаходом можна вводити у формі фармацевтичних композицій. Ці композиції можна приготувати способом, добре відомим у фармацевтиці, і їх можна вводити різними шляхами залежно від того, чи потрібне місцеве або системне лікування, та від області, що підлягає лікуванню. Введення може бути місцевим (включаючи транскермальне, епідермальне, офтальмологічне та на слизові оболонки, включаючи інтраназальне, вагінальне та ректальне введення), легневим (наприклад, шляхом інгаляції або інсуфляції порошків або аерозолів, зокрема за допомогою небулайзера; інтратрахеально або інтраназально), перорально або парентерально. Парентеральне введення включає внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, підшкірну, внутрішньоочеревинну, внутрішньом'язову ін'єкцію або інфузію; або внутрішньочерепне, наприклад, інтратекальне або внутрішньошлуночкове введення. Парентеральне введення може здійснюватися у формі одноразової болюсної дози або може здійснюватися, наприклад, за допомогою перфузійного насоса безперервної дії. Фармацевтичні композиції для місцевого застосування можуть включати транскермальні пластири, мазі, лосьйони, креми, гелі, краплі, супозиторії, спреї, рідини і порошки. Звичайні фармацевтичні носії, водні, порошкові або масляні основи, загусники тощо можуть бути необхідними або бажаними.

У деяких варіантах реалізації введення являє собою місцеве введення. У деяких варіантах здійснення введення являє собою місцеве нанесення на шкіру.

У деяких варіантах реалізації введення являє собою пероральне введення.

Цей винахід також включає фармацевтичні композиції, які містять в якості активного інгредієнта сполуку за винаходом або її фармацевтично прийнятну сіль в комбінації з одним або більшою кількістю фармацевтично прийнятних носіїв (наповнювачами). У деяких варіантах реалізації композиція являє собою відповідну композицію для місцевого застосування. Під час приготування композицій за цим винаходом активний інгредієнт зазвичай змішують з наповнювачем, розводять наповнювачем або заключають в такий носій, наприклад, в формі капсули, саше, паперу або іншого контейнера. Коли наповнювач служить розчинником, він може бути твердим, напівтвердим або рідким матеріалом, який діє як несуче середовище, носій або



середовище для активного інгредієнта. Таким чином, композиції можуть бути в формі таблеток, пігулок, порошків, пастилок, саше, облаток, еліксирів, суспензій, емульсій, розчинів, сиропів, аерозолів (у твердому або рідкому середовищі), мазей, що містять, наприклад, до 10 % від ваги активної сполуки, м'яких та твердих желатинових капсул, супозиторіїв, стерильних розчинів для ін'єкцій або стерильних упакованих порошків.

При формуванні складу препарату активна сполука може бути подрібнена для забезпечення частинок відповідного розміру перед об'єднанням з іншими інгредієнтами. Якщо активна сполука практично нерозчинна, її можна подрібнювати до розміру частинок менше 200 меш. Якщо активна сполука в значній мірі розчинна у воді, розмір частинок можна регулювати подрібненням, щоб забезпечити практично однорідний розподіл в композиції, наприклад, близько 40 меш.

Сполуки за винаходом можуть бути подрібнені з використанням відомих процедур подрібнення, як-от мокрий помел, для отримання розміру частинок, що підходить для утворення таблеток і для інших типів композицій. Дрібнодисперсні (наночастинки) препарати сполук за винаходом можуть бути отримані способами, відомими в цій галузі, наприклад, див. Міжнародну заявку № WO 2002/000196.

Деякі приклади придатних ексципієнтів включають лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбіт, маніт, крохмаль, гуміарабік, фосфат кальцію, альгірати, трагакант, желатин, силікат кальцію, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, целюлозу, воду, сиропи і метилцелюлозу. Композиції можуть додатково включати: змашувальні агенти, як-от тальк, стеарат магнію та мінеральні масла; змочуючі агенти; емульгуючі та суспендуючі агенти; консерванти, як-от метил- та пропілгідроксibenзоати; підсолоджувачі та ароматизатори. Композиції за винаходом можуть бути складені таким чином, щоб забезпечувати швидке, уповільнене або відстрочене вивільнення активного інгредієнта після введення пацієнтові з використанням процедур, відомих в цій області.

У деяких варіантах реалізації фармацевтична композиція містить силікатизовану мікрокристалічну целюлозу (SMCC-silicified microcrystalline cellulose) і щонайменше одну сполуку, описану в цьому документі, або її фармацевтично прийнятну сіль. У деяких варіантах реалізації силікатизована мікрокристалічна целюлоза містить близько 98 % мікрокристалічної целюлози і близько 2 % діоксиду кремнію за масою.

У деяких варіантах реалізації композиція являє собою композицію з уповільненим вивільненням, що містить щонайменше одну сполуку, описану в цьому документі, або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення композиція містить щонайменше одну сполуку, описану в цьому документі, або її фармацевтично прийнятну сіль, і щонайменше один компонент, вибраний з мікрокристалічної целюлози, моногідрату лактози, гідроксипропілметилцелюлози і поліетиленоксиду. У деяких варіантах реалізації композиція містить щонайменше одну сполуку, описану в цьому документі, або її фармацевтично прийнятну сіль, і мікрокристалічну целюлозу, моногідрат лактози і гідроксипропілметилцелюлозу. У деяких варіантах реалізації композиція містить щонайменше одну сполуку, описану в даному документі, або її фармацевтично прийнятну сіль, і мікрокристалічну целюлозу, моногідрат лактози і поліетиленоксид. У деяких варіантах реалізації композиція додатково містить стеарат магнію або діоксид кремнію. У деяких варіантах реалізації мікрокристалічна целюлоза являє собою Avicel PH102™. У деяких варіантах реалізації моногідрат лактози являє собою Fast-flo 316™. У деяких варіантах реалізації гідроксипропілметилцелюлоза являє собою гідроксипропілметилцелюлозу 2208 K4M (наприклад, Methocel K4 M Premier™) та/або гідроксипропілметилцелюлозу 2208 K100LV (наприклад, Methocel K00LV™). У деяких варіантах реалізації поліетиленоксид являє собою поліетиленоксид WSR 1105 (наприклад, Polyox WSR 1105™).

У деяких варіантах реалізації для отримання композиції використовується процес вологої грануляції. У деяких варіантах здійснення для отримання композиції використовується процес сухої грануляції.

Композиції можуть бути складені у вигляді стандартної лікарської форми, причому кожна доза містить від близько 1 до близько 1000 мг, від близько 1 мг до близько 100 мг, від 1 мг до близько 50 мг і від близько 1 мг до 10 мг активного інгредієнта. Переважно доза становить від близько 1 мг до близько 50 мг або від близько 1 мг до близько 10 мг активного інгредієнта. У деяких варіантах реалізації кожна доза містить близько 10 мг активного інгредієнта. У деяких варіантах реалізації кожна доза містить близько 50 мг активного інгредієнта. У деяких варіантах реалізації кожна доза містить близько 25 мг активного інгредієнта. Термін "лікарські форми з однократним дозуванням" стосується фізично дискретних одиниць, придатних в якості одиничних доз для людей та інших ссавців, причому кожна одиниця містить заздалегідь

визначену кількість активного матеріалу, розраховану для отримання бажаного терапевтичного ефекту, в поєднанні з відповідним фармацевтичним наповнювачем.

У деяких варіантах реалізації композиції містять від близько 1 до близько 1000 мг, від близько 1 мг до близько 100 мг, від 1 мг до близько 50 мг і від близько 1 мг до 10 мг активного інгредієнта. Переважно композиції містять від близько 1 мг до близько 50 мг або від близько 1 мг до близько 10 мг активного інгредієнта. Фахівцю в цій області техніки буде зрозуміло, що це втілює сполуки або композиції, що містять від близько 1 мг до близько 10 мг, від близько 1 мг до близько 20 мг, від близько 1 мг до близько 25 мг, від близько 1 мг до близько 50 мг активного інгредієнта.

У деяких варіантах реалізації дозування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі складає 15, 30, 60 або 90 мг в перерахунку на вільну основу. У деяких варіантах реалізації дозування складає 15, 30, 60 або 90 мг в перерахунку на вільну основу. Сполуки 4 або її фармацевтично прийнятної солі. У деяких варіантах реалізації дозування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі становить 15 мг в перерахунку на вільну основу. У деяких варіантах реалізації дозування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі становить 30 мг в перерахунку на вільну основу. У деяких варіантах реалізації дозування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі становить 60 мг в перерахунку на вільну основу. У деяких варіантах реалізації дозування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі складає 90 мг в перерахунку на вільну основу.

Активна сполука може бути ефективною в широкому діапазоні доз і зазвичай вводиться в фармацевтично ефективній кількості. Однак слід розуміти, що кількість сполуки, яка фактично вводиться, зазвичай визначається лікарем відповідно до обставин, включаючи стан, який необхідно лікувати, вибраний шлях введення, сполуку, що фактично вводиться, вік, вагу, реакцію окремого пацієнта, тяжкість симптомів пацієнта тощо.

Для приготування твердих композицій, як-от таблетки, основний активний інгредієнт змішують з фармацевтичним наповнювачем з утворенням твердої попередньої рецептури композиції, яка містить гомогенну суміш сполуки за цією заявкою. При посиленнях на ці попередні рецептури композиції, як гомогенні, активний інгредієнт зазвичай рівномірно диспергований по всій композиції, так що композицію можна легко розділити на однаково ефективні стандартні лікарські форми, як-от таблетки, пігулки і капсули. Ці тверді попередні рецептури ділять на стандартні лікарські форми описаного вище типу, що містять, наприклад, від 0,1 до близько 1000 мг активного інгредієнта за цією заявкою.

Таблетки або пігулки за цим винаходом можуть бути покриті оболонкою або складені іншим чином для отримання лікарської форми, що забезпечує перевагу пролонгованої дії. Наприклад, таблетка або пігулка може містити компонент внутрішньої дози і компонент зовнішньої дози, причому останній перебуває в формі оболонки, що покриває перший. Два компоненти можуть бути розділені ентросолюбільним шаром, який слугує для запобігання дезінтеграції в шлунку та дозволяє внутрішньому компоненту проходити неухводженим в дванадцятипалу кишку або затримуватися при вивільненні. Для таких ентросолюбільних шарів або покриттів можуть бути використані різні матеріали, в тому числі низка полімерних кислот і сумішей полімерних кислот з такими матеріалами, як шелак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Рідкі форми, в які можуть бути включені солі та композиції за цією заявкою для перорального або ін'єкційного введення, включають в себе водні розчини, сиропи з відповідним смаком, водні або масляні суспензії та ароматизовані емульсії з харчовими оліями, як-от бавовняна олія, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, а також еліксири та аналогічні фармацевтичні носії.

Композиції для інгаляції або інсуфляції включають розчини та суспензії у фармацевтично прийнятних водних або органічних розчинниках або їх сумішах, і порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні ексципієнти, описані вище. У деяких варіантах реалізації композиції вводяться пероральним або назальним респіраторним шляхом для місцевого або системного ефекту. Композиції можна розпорошувати за допомогою інертних газів. Розчини для розпилення можна вдихати безпосередньо з розпилювального пристрою, або пристрій для розпилення може бути прикріплений до покриття маски для обличчя або дихального апарату з періодичним позитивним тиском. Композиції у вигляді розчину, суспензії або порошку можна вводити перорально або назально за допомогою пристроїв, які забезпечують доставку композиції відповідним чином.

Композиції для місцевого застосування можуть містити один або більше звичайних носіїв. У деяких варіантах реалізації мазі можуть містити воду і один або більше гідрофобних носіїв, вибраних, наприклад, з рідкого парафіну, поліоксіетилена алкілового етеру, пропіленгліколю, білого вазеліну тощо. Композиції носія кремів можуть бути на основі води в поєднанні з

гліцерином і одним або більше іншими компонентами, наприклад гліцеринмоностеаратом, ПЕГ-гліцеринмоностеарат і цетилстеариловим спиртом. Гелі можуть бути складені з використанням ізопропілового спирту і води, відповідним чином в поєднанні з іншими компонентами, як-от, наприклад, гліцерин, гідроксіетилцелюлоза тощо. У деяких варіантах реалізації композиції для місцевого застосування містять щонайменше близько 0,1, щонайменше близько 0,25, щонайменше близько 0,5, щонайменше близько 1, щонайменше близько 2 або щонайменше близько 5 % мас. сполуки за винаходом. Композиції для місцевого застосування можуть бути відповідним чином упаковані в тубики, наприклад, місткістю 100 г, які необов'язково пов'язані з інструкціями з лікування вибраного показання, наприклад псоріазу або іншого стану шкіри.

Кількість сполук або композицій, що вводяться пацієнтові, буде варіюватися залежно від того, що вводиться, від цілі введення, як-от профілактика або терапія, стану пацієнта, способу введення, тощо. У терапевтичних цілях композиції можна вводити пацієнту, який вже страждає на захворювання, в кількості, достатній для виліковування або щонайменше часткового купірування симптомів захворювання та його ускладнень. Ефективні дози будуть залежати від хворобливого стану, який лікують, а також від висновку лікуючого лікаря залежно від факторів, як-от тяжкість захворювання, вік, вага і загальний стан пацієнта, тощо.

Композиції, що вводяться пацієнтові, можуть перебувати у формі фармацевтичних композицій, описаних вище. Ці композиції можна стерилізувати звичайними методами стерилізації або можна стерилізувати фільтруванням. Водні розчини можуть бути упаковані для використання як є або ліофілізовані, при цьому ліофілізований препарат перед введенням об'єднують зі стерильним водним носієм. РН препаратів сполук зазвичай становить від 3 до 11, більш переважно від 5 до 9 і найбільш переважно від 7 до 8. Слід розуміти, що використання деяких із вищеперерахованих наповнювачів, носіїв або стабілізаторів призведе до утворення фармацевтичних солей.

Терапевтична доза сполуки за цією заявкою може варіюватися залежно, наприклад, від конкретного застосування, для якого проводять лікування, способу введення сполуки, здоров'я і стану пацієнта та висновку про призначення лікуючого лікаря. Частка або концентрація сполуки за винаходом у фармацевтичній композиції може варіюватися залежно від низки факторів, включаючи дозування, хімічні характеристики (наприклад, гідрофобність) та шлях введення. Наприклад, сполуки за цим винаходом можуть бути представлені у водному фізіологічному буферному розчині, що містить від близько 0,1 до близько 10 % мас./об. сполуки для парентерального введення. Деякі типові діапазони доз являють собою від близько 1 мг/кг до близько 1 г/кг маси тіла на добу. У деяких варіантах реалізації діапазон доз являє собою від близько 0,01 мг/кг до близько 100 мг/кг маси тіла на добу. Дозування, ймовірно, буде залежати від таких змінних, як тип і ступінь прогресування захворювання або порушення, загальний стан здоров'я конкретного пацієнта, відносна біологічна ефективність вибраної сполуки, склад допоміжної речовини і спосіб її введення. Ефективні дози можна екстраполювати з кривих доза-відповідь, отриманих з *in vitro* тест-систем або на моделях тварин.

Композиції за винаходом можуть додатково включати один або більше додаткових фармацевтичних агентів, приклади яких перераховані вище.

#### Набори

Ця заявка також включає фармацевтичні набори, придатні, наприклад, для лікування і/або профілактики пов'язаних з цитокінами захворювань або порушень, як-от CRS, які включають один або більше контейнерів, що містять фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки, описаної в цьому документі. Такі набори можуть додатково включати в себе, якщо бажано, один або більше різних традиційних компонентів набору, як-от, наприклад, контейнери з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями, додаткові контейнери тощо, як буде очевидно фахівцям в цій області техніки. У набір також можуть бути включені інструкції у вигляді вкладишів або етикеток із зазначенням кількості компонентів, що вводяться, посібника із застосування і/або посібника зі змішування компонентів.

#### ПРИКЛАДИ

Винахід буде описаний більш детально на конкретних прикладах. Наведені нижче приклади пропонуються для ілюстративних цілей і жодним чином не призначені для обмеження винаходу. Спеціалісти в цій області легко розпізнають безліч некритичних параметрів, які можуть бути змінені або модифіковані для отримання практично тих самих результатів.

#### Приклад А. Аналіз кінази JAK *in vitro*

Інгібітори JAK1, які можна використовувати для лікування захворювань або порушень, пов'язаних з цитокінами, тестують на інгібуючу активність JAK-мішеней згідно наступного аналізу *in vitro*, описаного в Park et al., *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104. Каталітичні домени JAK1 людини (а. з. 837-1142), JAK2 (а. з. 828-1132) і JAK3 (а. з. 781-1124) з N-кінцевою

міткою His експресуються з використанням бакуловірусу в клітинах комах і очищаються. Каталітичну активність JAK1, JAK2 і JAK3 аналізували шляхом вимірювання фосфорилування біотинильованого пептиду. Фосфорильований пептид детектували за допомогою гомогенної флуоресценції, розділеної в часі (HTRF). IC<sub>50</sub> сполук вимірюється для кожної кінази в реакціях об'ємом 40 мкл, які містять фермент, АТФ і 500 нМ пептид в 50 мМ Тріс (рН 7,8) буфері з 100 мМ NaCl, 5 мМ DTT і 0,1 мг/мл (0,01 %) BSA. Для 1 мМ вимірювань IC<sub>50</sub> концентрація АТФ в реакціях становить 1 мМ. Реакції проводять при кімнатній температурі протягом 1 години, а потім зупиняють за допомогою 20 μл 45 мМ EDTA, 300 нМ SA-APC, 6 нМ Eu-Py20 в буфері для аналізу (Perkin Elmer, Бостон, Массачусетс) Зв'язування з антитілом, міченим європієм, відбувається протягом 40 хвилин, і сигнал HTRF вимірюють на планшет-рідері Fusion (Perkin Elmer, Бостон, Массачусетс). Сполуки в Таблиці 1 були протестовані в цьому аналізі, і було показано, що вони мають значення IC<sub>50</sub> в Таблиці 1.

Приклад Б. Дослідження безпеки та ефективності інгібіторів JAK1 і/або JAK2 у суб'єктів з помірним і важким гнійним гідраденітом

Рандомізоване подвійне сліпе плацебо-контрольоване багатоцентрове дослідження проводиться за участю чоловіків і жінок у віці 18-75 років з гнійним гідраденітом від помірного (стадія Херлі II) до важкого (стадія Херлі III) гнійного гідраденіту протягом не менше 6 місяців I стадія Херлі пов'язана з утворенням абсцесу (одиночного або множинного) без синусових ходів і рубцювання. II стадія Херлі пов'язана з рецидивуючими абсцесами з утворенням трактів і рубцюванням; поодинокі або множинні, широко розділені ураження. Стадія Херлі III пов'язана з дифузним або майже дифузним ураженням або множинними взаємопов'язаними трактами і абсцесами по всій області. Учасники дослідження були рандомізовані на 5 груп (близько 50 учасників в групі) і отримували 15, 30, 60 або 90 мг інгібітору JAK1 і/або JAK2 (наприклад, руксолітинібу, сполуки 4 або сполуки 5, або їх фармацевтично прийнятної солі) або плацебо. На 16 тижні (первинна кінцева точка) учасників групи плацебо повторно рандомізують у рівній мірі в групи активного лікування протягом 8 тижнів. Подвійний сліпий метод підтримується. Первинною кінцевою точкою є частка суб'єктів, які досягли клінічної відповіді на гнійний гідраденіт (HiSCR-Hidradenitis Suppurativa Clinical Response) на 16 тижні.

Вторинні кінцеві точки включають (1) частку суб'єктів з HiSCR в порівнянні з вихідним рівнем при кожному відвідуванні; (2) частку суб'єктів, у яких кількість абсцесів і запальних вузлів (AN) становить від 0 до 2 при кожному відвідуванні; (3) середнє відхилення від вихідного рівня числової шкали оцінки болю HS1) при кожному відвідуванні; (4) зміну модифікованої шкали Сарторіуса на 16 і 24 тижні; (5) зміну кількості дренажних свищів при кожному відвідуванні; (6) частку суб'єктів, яким потрібне резервне лікування уражень до 24 тижня; (7) кількість епізодів відновного лікування уражень до 24 тижня; (8) популяційну ФК інгібітору JAK1 і/або JAK2 (наприклад, уявний кліренс, уявний об'єм розподілу); (9) безпеку і переносимість, оцінену шляхом моніторингу частоти, тривалості та тяжкості НЯ, фізичного огляду, показників життєво важливих функцій і лабораторних даних для гематології, хімічного аналізу сироватки і аналізу сечі; (10) оцінку зміни індексу якості життя дерматології (DLQI-Dermatology Quality of Life Index); (11) зміну тяжкості захворювання в порівнянні з вихідним рівнем за шкалою IHS43 при кожному відвідуванні; (12) зміну оцінки якості життя з гнійним гідраденітом (HiSQOL-hidradenitis suppurativa quality of life) при кожному відвідуванні в порівнянні з вихідним рівнем; і (13) оцінку залежності "доза/вплив-відповідь" на відсоткову зміну від вихідного рівня з точки зору кінцевих точок ефективності та безпеки протягом періодів лікування.

HiSCR визначається як зменшення як мінімум на 50 % кількості абсцесів і запальних вузлів (AN-abscess and inflammatory nodule) без збільшення кількості абсцесів і відсутності збільшення кількості дренажних свищів на 16 тижні в порівнянні з вихідним рівнем). Числова шкала оцінки болю використовується для оцінки найгіршого шкірного і середнього шкірного болю через HS. Оцінки за двома пунктами варіюються від 0 (відсутність шкірного болю) до 10 (шкірна біль настільки сильна, наскільки ви можете собі уявити). Оцінки записуються учасниками в щоденник перед сном і базуються на періоді спогадів "за останні 24 години". Модифікована шкала Сарторіуса використовується для кількісної оцінки ступеня тяжкості HS. Бали присуджуються за 12 областей тіла (ліва і права пахвова западина, ліва і права суб/інфрамамарна області, міжмамарна область, ліва і права сідниці, ліва і права пахово-стегнові складки, періанальна область, область промежини тощо): бали нараховуються за вузлик (по 2 бали); абсцеси (4 бали); свищі (4 бали); шрам (1 бал); і найбільшу відстань між двома ушкодженнями (2-6 балів, 0, якщо пошкоджень немає); і чи розділені ураження нормальною шкірою (так - 0 балів; немає - 6 балів). Загальна шкала Сарторіуса являє собою суму 12 регіональних оцінок. Рятувальна терапія при ураженні: в разі, якщо гостро болюче ураження вимагає негайного втручання, лікарі можуть провести рятувальні втручання. Дозволені лише два типи втручання: (1) ін'єкція суспензії

тріамцинолону ацетоніду всередині осередку ураження (всього до 30 мг за одне відвідування) і/або (2) розріз і дренажування. Втручання може проводитися максимум на двох різних ураженнях за одне відвідування або на одному і тому ж ураженні при двох різних відвідуваннях для дослідження. Одне і те саме ураження не можна лікувати два рази за одне відвідування. Якщо суб'єкту потрібно більше двох втручань до 16 тижня, його виключають з дослідження. Міжнародна система оцінки тяжкості супуративного гідраденіту (HS4): ІН4 (бали) = (кількість вузликів × 1) + (кількість абсцесів × 2) + (кількість дренажних тунелів [свищів/пазух] × 4). Легкий HS: ≤ 3 балів; Помірний HS: 4-10 балів; Важкий HS: ≥11 балів.

Досліджуване лікування 1 (активне) включає пероральну таблетку, яка містить 15 мг 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н, 1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід. Рівні дозування включають 15 мг (1 таблетка), 30 мг (2 таблетки), 60 мг (4 таблетки) і 90 мг (6 таблеток). Досліджуване лікування 2 (плацебо) включає пероральні таблетки плацебо.

Зразки крові для вимірювання концентрацій інгібітору JAK1 і/або JAK2 в плазмі беруться в моменти часу, щонайменше, на 2, 12, 16, 20 і 24 тижні до і після введення досліджуваного препарату до прийому, через 1 годину після прийому дози і через 2-5 годин після введення дози. При передчасному візиті для скасування, якщо суб'єкти припиняють лікування до 8 тижнів, якщо це можливо, збирають зразок РК. Також записується дата/час останнього попереднього введення дози.

Тести на перевагу інгібітору JAK1 і/або JAK2 в дозі 90, 60, 30 і 15 мг в порівнянні з плацебо проводять з використанням процедури Хохберга при загальному двосторонньому рівні  $\alpha = 0,05$ . Порівняння між кожною активною групою і плацебо на 16 тижні виконується за допомогою логістичної регресії. При всіх рівнях доз тести на перевагу значимі (наприклад, на 10 %, 20 %, 30 %, 40 % або 50 % поліпшення HiSCR (Клінічна відповідь на гнійний гідраденіт)) і демонструють ефективність інгібітору JAK1 і/або JAK2 для лікування HS. Тести показують зменшення кількості вузликів і неменшу ефективність/перевагу в порівнянні з плацебо.

Всі вторинні і дослідницькі заходи ефективності оцінюються з використанням описової статистики. Дані про клінічну безпеку (показники життєдіяльності, стандартні лабораторні аналізи і НЯ) аналізуються з використанням описової статистики. Визначають взаємозв'язок "вплив-відповідь" (E-R - "Exposure-response") між РК-експозиціями плазмового інгібітору JAK1 і/або JAK2 і даними ефективності/безпеки. Проміжний аналіз для оцінки реакції на лікування і полегшення планування майбутніх досліджень проводиться, коли принаймні половина рандомізованих суб'єктів досягає 16 тижня.

Приклад С. Експресія янус-кінази в кератиноцитах, індукована інтерфероном-гамма і фактором некрозу пухлин-альфа і подальша продукція медіаторів запалення

Трансформовані клітини кератиноцитів людини (HaCaT) були придбані у AddexBio (кат. № T0020001) і культивовані в оптимізованому середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (AddexBio, кат. № C0003-02) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Hyclone, кат. № 16140-071) і 1х Пеніцилін/Стрептоміцин (Gibco, кат. № 15140-122). Коли клітини досягли 80-90 % конфлюентності, їх промивали 1х DPBS, потім відокремлювали від колб для тканинних культур шляхом інкубації з 0,25 % трипсином (Gibco, кат. № 25200-056) протягом 3-5 хвилин при 37 °C/5 %CO<sub>2</sub>. До трипсинізованих клітин додавали середовище для культивування клітин, потім суспензію клітин переносили в стерильну центрифужну пробірку на 15 мл для центрифугування протягом 10 хвилин зі швидкістю 1300 об./хв. Середовище, що містить трипсин, відсмоктували з осаду клітин, а потім осад повторно суспендували в 10 мл середовища для культивування клітин. Клітини підраховували з використанням автоматичного лічильника клітин Countess II, потім висівали в 24-лункові планшети, оброблені культурою тканини, при концентрації  $4 \times 10^4$  клітин/мл і інкубували протягом 48 годин при 37 °C/5 %CO<sub>2</sub>. Через 48 годин середовище видаляли і замінювали 500 мкл середовища для культивування клітин або комбінованої стимуляції рекомбінантним людським гамма-інтерфероном (R & D Systems, Каталог № 285-IF-100) і рекомбінантним фактором некрозу пухлини людини альфа (R & D Systems, Каталог № 210-TA-020). Клітини HaCaT, оброблені комбінаторною цитокиновою стимуляцією, обробляли в кінцевих концентраціях 10 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл або 100 нг/мл кожного цитокину. Оброблені планшети перемішували обережним струшуванням протягом 30 секунд, потім інкубували протягом 24 годин при 37 °C/5 %CO<sub>2</sub>. В кінці 24-годинної інкубації середовище негайно видаляли з кожної чашки.

РНК виділяли з клітин HaCaT з використанням реагентів і протоколів QuantiGene Plex Assay (Affymetrix, кат. № QGP-232-M18042302). Клітини промивали 1х DPBS, потім лізували шляхом інкубації з наданим буфером для лізису QuantiGene протягом 30 хвилин при 50-55 °C. Лізати клітин інкубували протягом 18-24 годин при 55 °C з уловлюючими гранулами і набором зондів,

5 розробленим для специфічної гібридизації з мРНК з мішеней, що становлять інтерес. Панель з 32 мішеней, що становлять інтерес, включала гени домашнього господарства, що використовуються для нормалізації результатів. Після 18-24-годинної інкубації сигнал ампліфікували з використанням методик розгалуженої ДНК відповідно до процедур виробника (Affymetrix, № в каталозі QGP-232-M18042302). Після стадій гібридизації і промивання аналітичний планшет зчитували на Lumipex 200 і дані виражали як чисту середню інтенсивність флуоресценції. Потім дані були нормалізовані за чистою середньою інтенсивністю флуоресценції гена домашнього господарства HPRT1 (Таблиця 2).

Таблиця 2

Стимуляція кератиноцитів людини TNFα і IFNγ індукує шлях JAK/STAT і прозапальні цитокіни

Ген	Лікування	MFI <sup>a</sup>	p-величина
JAK1	Несуче середовище	126,7±6,55	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	178,19±3,41	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	195,02±3,47	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	198,23±2,52	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	207,34±3,91	<0,0001
JAK2	Несуче середовище	21,7±0,53	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	154,13±11,65	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	174,07±12,34	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	180,71±13,63	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	187,94±13,12	<0,0001
JAK3	Несуче середовище	0,1±0,02	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	0,16±0,05	0,8111
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	0,18±0,05	0,596
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	0,33±0,06	0,0082
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	0,28±0,06	0,0532
TYK2	Несуче середовище	167,84±2,25	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	240,49±4,4	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	250,15±3,41	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	257,24±3,55	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	265,37±3,1	<0,0001
STAT1	Несуче середовище	484,33±4,52	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	3834,09±65,62	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	3935,51±66,15	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	3943,03±63,05	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	4136,09±67,06	<0,0001
STAT3	Несуче середовище	606,76±11,51	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	1561,14±40,35	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	1652,97±39,53	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	1666,52±52,15	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	1742,81±38,26	<0,0001
STAT4	Несуче середовище	2,27±0,12	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	3,78±0,22	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	3,84±0,23	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	3,72±0,25	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	3,61±0,28	0,0003
STAT5A	Несуче середовище	1,03±0,1	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	26,06±3,1	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	28,58±3,23	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	31,01±3,37	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	29,61±2,91	<0,0001
STAT6	Несуче середовище	626,95±22	-
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	1010,38±14,28	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	1044,97±12,71	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	1039,59±10,5	<0,0001

Стимуляція кератиноцитів людини TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  індукує шлях JAK/STAT і прозапальні цитокіни

Ген	Лікування	MFI <sup>a</sup>	p-величина
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	1059,01 $\pm$ 13,45	<0,0001
IL1A	Несуче середовище	156,9 $\pm$ 1,89	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	1786,44 $\pm$ 31,13	<0,0001
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2135,03 $\pm$ 66,58	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2256,89 $\pm$ 90,79	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2459,6 $\pm$ 106,2	<0,0001
IL6	Несуче середовище	5,89 $\pm$ 0,19	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	311,31 $\pm$ 38,81	0,0002
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	410,93 $\pm$ 52,93	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	464,27 $\pm$ 61,46	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	519,31 $\pm$ 68,04	<0,0001

<sup>a</sup>Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка (SEM)

Білки-мішені, що становлять інтерес, в середовищі були виявлені і кількісно визначені з використанням реагентів і протоколів для мультиплексного імуноаналізу ProCarta (Invitrogen, каталожний номер EPX450-12171-901). Середовище інкубували з гранулами, кон'югованими з антитілами, призначеними для зв'язування з епітопами конкретних білків-мішеней і ідентифікації зв'язаного білка за характерним спектральним малюнком гранул. Біотинільовані детектуючі антитіла, призначені для зв'язування з різними епітопами одних і тих самих білків-мішеней, і стрептавідин-PE додають в аналітичні планшети для кількісного визначення кількості білка-мішені. Планшети для аналізу зчитували на Lumineх 200, і дані виражали як чисту середню інтенсивність флуоресценції. Значення чистої медіанної інтенсивності флуоресценції для стандартної кривої антигену, побудованої відповідно до процедур виробника (Invitrogen, кат. № EPX450-12171-901), наносили на графік залежно від очікуваних концентрацій для кожного стандарту. Концентрація кожного білка екстраполювалася зі стандартної кривої антигену, і концентрації виражалися в пг/мл (Таблиця 3).

Таблиця 3

Стимуляція кератиноцитів людини TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  індукує продукцію прозапальних цитокінів

Білок	Лікування	пг/мл <sup>a</sup>	p-величина
IL-1 $\alpha$	Несуче середовище	0,37 $\pm$ 0,05	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	13,22 $\pm$ 1,24	<0,0001
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	15,12 $\pm$ 1,48	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	14,74 $\pm$ 1,45	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	13,64 $\pm$ 1,29	<0,0001
IL-6	Несуче середовище	72,86 $\pm$ 9,77	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2012,1 $\pm$ 337,23	0,0001
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2329,01 $\pm$ 384,78	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2208,6 $\pm$ 370,81	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	1889,75 $\pm$ 298,39	0,0004
IP-10	Несуче середовище	16,61 $\pm$ 1,6	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	3275,51 $\pm$ 174,48	<0,0001
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	3243,28 $\pm$ 178,41	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	3209,56 $\pm$ 211,43	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	2978,45 $\pm$ 167,27	<0,0001
MIP1 $\alpha$	Несуче середовище	7,47 $\pm$ 1,13	-
	10 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	525,75 $\pm$ 87,5	<0,0001
	25 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	546,69 $\pm$ 92,35	<0,0001
	50 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	531,55 $\pm$ 91,88	<0,0001
	100 нг/мл TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$	409,14 $\pm$ 60,62	0,0012
RANTES	Несуче середовище	11,78 $\pm$ 1,41	-

Стимуляція кератиноцитів людини TNFα і IFNγ індукує продукцію прозапальних цитокінів

Білок	Лікування	пг/мл <sup>a</sup>	p-величина
	10 нг/мл TNFα/IFNγ	126,13±5,15	<0,0001
	25 нг/мл TNFα/IFNγ	127,73±2,8	<0,0001
	50 нг/мл TNFα/IFNγ	119,95±4,67	<0,0001
	100 нг/мл TNFα/IFNγ	103,48±7,09	<0,0001

<sup>a</sup>Дані представлені як середнє значення ± стандартна помилка (SEM)

Приклад D. Інгібітори янус-кінази перешкоджають інтерферон-гамма і запаленню, опосередкованому некрозом пухлини-альфа, в кератиноцитах.

Трансформовані клітини кератиноцитів людини (HaCaT) були придбані у AddexBio (кат. № T0020001) і культивовані, як зазначено в Прикладі С. Чотири сполуки А-D (А: руксолітиніб, В: ітацитиніб, С: 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1H, 1'H-4,4'бпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід, D: ((2R, 5S)-5-{2-[(1R)-1-гідроксіетил]-1H-імідазо[4,5-d]тієно[3,2-b]піридин-1-іл}тетрагідро-2H-піран-2-іл)ацетонітрил) були відновлені в ДМСО, потім кожна сполука була серійно розбавлена середовищем для культивування клітин до концентрацій 400 нМ, 200 нМ, 100 нМ і 50 нМ. Через 48 годин середовище для культивування клітин видаляли з 24-лункових планшетів і замінювали 250 мкл середовища, що містить серійно розведені ліки, потім інкубували протягом 15 хвилин при 37 °C/5 %CO<sub>2</sub>. Після інкубації лікарського засобу в планшети додавали 250 мкл комбінаторної стимуляції, що містить рекомбінантний людський інтерферон гамма (R&D Systems, кат. № 285-IF-100) і рекомбінантний фактор некрозу пухлини людини альфа (R&D Systems, кат. № 210-TA-020). Кінцева концентрація рекомбінантного людського інтерферону гамма і рекомбінантного фактора некрозу пухлини людини альфа становила 25 нг/мл кожного цитокіну. Цитокінова стимуляція, додана в лунки, що містять лікарський засіб, доводила кінцеві концентрації для кожної обробки ліками до 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ і 200 нМ. Оброблені планшети перемішували обережним струшуванням протягом 30 секунд, потім інкубували протягом 24 годин при 37 °C/5 %CO<sub>2</sub>. Після закінчення 24-годинної інкубації середовище негайно видаляли з кожного планшета.

РНК виділяли з клітин HaCaT з використанням реагентів і протоколів QuantiGene Plex Assay (Affymetrix, кат. № QGP-232-M18042302) відповідно до інструкцій виробника. Клітини промивали 1x DPBS, потім лізували шляхом інкубації з наданим буфером для лізису QuantiGene протягом 30 хвилин при 50-55 °C. Лізати клітин інкубували протягом 18-24 годин при 55 °C з уловлюючими гранулами і набором зондів, розробленим для специфічної гібридизації з мРНК з мішеней, що становлять інтерес. Гени включали гени домашнього господарства (наприклад, HPRT1, GAPDH), що використовуються для нормалізації результатів. Після 18-24-годинної інкубації сигнал ампліфікували з використанням методик розгалуженої ДНК відповідно до процедур виробника (Affymetrix, № в каталозі QGP-232-M18042302). Після стадій гібридизації і промивання аналітичний планшет зчитували на LumineX 200 і дані виражали як чисту середню інтенсивність флуоресценції. Потім дані були нормалізовані за чистою середньою інтенсивністю флуоресценції гена домашнього господарства HPRT1 (Таблиця 4).

Таблиця 4

Нормалізована експресія генів-мішеней в клітинах кератиноцитів людини, стимульованих TNFα і IFNγ в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Ген	Стимуляція <sup>a</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>
JAK1	-	-	183,21±7,55							
	25 нг/мл	-	213,93±5,55 <sup>e</sup>							
	-	200 нМ	159,13±7	-	171,53±	-	177,67±	-	177,97±	-



Нормалізована експресія генів-мішеней в клітинах кератиноцитів людини, стимульованих TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Ген	Стимуляція <sup>a</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>
			,08		9,49		11,84		14,91	
	25 нг/мл	25 нМ	206,18±7,99	0,894	216,23±6,41	0,9993	206,29±6,84	0,7834	200,4±9,84	0,5654
	25 нг/мл	50 нМ	195,48±9,54	0,2925	210,42±10,89	0,9965	194,2±8,24	0,0852	210,52±7,73	0,9942
	25 нг/мл	100 нМ	186,97±7,49	0,0621	205,03±11,49	0,9026	193,28±4,55	0,0669	200,25±8,15	0,5562
	25 нг/мл	200 нМ	180,99±8,58	0,0191	195,97±10,45	0,4597	182,86±4,07	0,0026	190,53±7,68	0,1286
JAK 2	-	-	25,35±0,95							
	25 нг/мл	-	126,63±4,89*							
	-	200 нМ	23,67±0,92	-	25,21±1,12	-	25,25±1,04	-	25,67±1,03	-
	25 нг/мл	25 нМ	89,4±2,21	<0,0001	109,39±2,8	0,0021	114,94±2,16	0,0419	108,89±3,25	0,0165
	25 нг/мл	50 нМ	69,7±1,78	<0,0001	101±2,26	<0,0001	107,16±2,86	0,0003	106,83±5,94	0,0063
	25 нг/мл	100 нМ	54,4±1,8	<0,0001	94,5±2,65	<0,0001	95,51±3,13	<0,0001	102,64±3,52	0,0007
	25 нг/мл	200 нМ	40,25±1,3	<0,0001	89,16±3,43	<0,0001	91,17±2,15	<0,0001	92,21±2,9	<0,0001
JAK 3	-	-	0,66±0,14							
	25 нг/мл	-	0,52±0,16							
	-	200 нМ	0,53±0,09	-	0,63±0,10	-	0,68±0,17	-	0,71±0,15	-
	25 нг/мл	25 нМ	0,81±0,15	0,5284	0,84±0,12	0,3247	1,02±0,19	0,1022	0,97±0,18	0,2187
	25 нг/мл	50 нМ	1,01±0,23	0,1284	0,83±0,15	0,3497	0,99±0,16	0,1493	0,99±0,20	0,1854
	25 нг/мл	100 нМ	0,84±0,13	0,4473	0,92±0,13	0,1608	0,99±0,15	0,1491	1,01±0,17	0,1531
	25 нг/мл	200 нМ	0,68±0,13	0,9133	0,79±0,15	0,4876	0,85±0,15	0,4323	0,86±0,16	0,4442
TYK 2	-	-	217,40±8,13							
	25 нг/мл	-	296,98±6,92*							
	-	200 нМ	205,57±10,87	-	217,28±10,09	-	217,28±14,28	-	220,78±12,01	-
	25 нг/мл	25 нМ	298,27±10,83	> 0,999	292,92±7,99	0,9929	283,97±8,59	0,5015	283,93±8,16	0,7981
	25 нг/мл	50 нМ	287,93±16,28	0,9305	287,31±11,08	0,8603	273,68±7,44	0,0823	307,36±14,87	0,8958
	25 нг/мл	100 нМ	260,21±7,05	0,0546	284,15±9,62	0,7043	266±6,82	0,0123	280,63±10,46	0,65
	25 нг/мл	200 нМ	264,75±8,44	0,1204	277,52±8,67	0,3578	263,49±5,05	0,0061	283,28±10,88	0,7707

Нормалізована експресія генів-мішеней в клітинах кератиноцитів людини, стимульованих TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Ген	Стимуляція <sup>a</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFІ <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>
STA T1	-	-	545,83±15,37							
	25 нг/мл	-	3106,13±217,15 <sup>¥</sup>							
	-	200 нМ	526,90±13,46	-	535,07±22,13	-	554,39±11,80	-	554,64±11,36	-
	25 нг/мл	25 нМ	2907,12±206,85	0,8632	2868,69±202,69	0,7833	3111,17±182,20	>0,9999	3164,74±242,35	0,9986
	25 нг/мл	50 нМ	2902,82±173,71	0,8544	2862,58±163,98	0,7685	3058,64±154,86	0,9989	3017,08±167,96	0,9928
	25 нг/мл	100 нМ	2712,93±182,91	0,3789	2790,32±176,4	0,5807	3035,33±122,14	0,995	2999,87±197,86	0,9862
	25 нг/мл	200 нМ	2475,58±134,64	0,0734	2857,2±174,57	0,7553	2984,14±163,4	0,9634	3161,66±135,8	0,9988
STA T3	-	-	751,20±14,97							
	25 нг/мл	-	1608,39±70,09 <sup>¥</sup>							
	-	200 нМ	728,97±20,48	-	732,19±23,03	-	746,17±16,73	-	750,90±27,68	-
	25 нг/мл	25 нМ	1434,08±43,26	0,074	1466,73±66,75	0,3206	1557,84±58,15	0,9399	1572,76±65,5	0,988
	25 нг/мл	50 нМ	1301,55±51,7	0,0005	1437,28±60,69	0,1762	1519,61±69,92	0,7044	1543,4±58,65	0,9042
	25 нг/мл	100 нМ	1150,46±52,66	<0,0001	1373,34±55,51	0,0352	1457,24±54,48	0,26	1549,17±89,41	0,9288
	25 нг/мл	200 нМ	1082,84±39,32	<0,0001	1400,77±58,44	0,0738	1483,1±51,73	0,4201	1570,19±51,51	0,9845
STA T4	-	-	4,52±0,64							
	25 нг/мл	-	6,19±0,53 <sup>€</sup>							
	-	200 нМ	3,75±0,33	-	4,01±0,45	-	4,28±0,61	-	4,32±0,53	-
	25 нг/мл	25 нМ	6,15±0,47	>0,999	6,00±0,46	0,9967	5,65±0,44	0,7981	5,4±0,45	0,5462
	25 нг/мл	50 нМ	5,57±0,53	0,7712	6,22±0,42	>0,999	5,41±0,33	0,5151	6,1±0,36	0,9997
	25 нг/мл	100 нМ	5,63±0,39	0,8269	6,21±0,48	>0,999	5,32±0,46	0,4157	5,83±0,34	0,9448
	25 нг/мл	200 нМ	5,25±0,45	0,4653	6,27±0,56	0,9999	5,04±0,36	0,1833	5,42±0,52	0,5691
STA T5A	-	-	2,17±0,54							
	25 нг/мл	-	26,41±2,26 <sup>¥</sup>							
	-	200 нМ	1,12±0,19	-	1,44±0,41	-	1,75±0,44	-	1,99±0,51	-
	25 нг/мл	25 нМ	19,04±1,94	0,0111	23,69±1,63	0,7471	22,82±1,77	0,4520	20,12±1,29	0,0428
	25 нг/мл	50 нМ	16,18±1,66	0,0003	22,32±2,16	0,4225	20,71±1,77	0,1117	22,69±1,71	0,3629
	25 нг/мл	100 нМ	12,94±1,27	<0,0001	20,87±2,1	0,1784	18,44±1,85	0,0138	19,54±1,34	0,0233

Нормалізована експресія генів-мішеней в клітинах кератиноцитів людини, стимульованих TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Ген	Стимуляція <sup>a</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	MFI <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>
	25 нг/мл	200 нМ	9,48±0,86	<0,0001	19,2±1,94	0,0505	17,64±1,46	0,0059	18,33±1,83	0,0059
STAT6	-	-	749,34±20,85							
	25 нг/мл	-	1045,99±26,73 <sup>¶</sup>							
	-	200 нМ	723,56±20,76	-	740,11±34,98	-	762,04±9,44	-	777,03±29,31	-
	25 нг/мл	25 нМ	1043,96±20,37	>0,999	1004,82±23,76	0,5557	1020,89±23,57	0,8238	1042,76±29,23	>0,999
	25 нг/мл	50 нМ	1016,85±25,68	0,8028	990,05±21,06	0,2895	982,62±14,34	0,1389	1046,46±29,12	>0,999
	25 нг/мл	100 нМ	966,76±28,58	0,0739	987,64±15,75	0,2557	943,66±25,99	0,0059	985,1±39,79	0,3955
	25 нг/мл	200 нМ	976,22±14,93	0,1487	985,17±29,31	0,224	966,51±12,3	0,0429	1013,25±17,15	0,8453
IL-1 $\alpha$	-	-	95,72±5,84							
	25 нг/мл	-	1405,01±27,93 <sup>¶</sup>							
	-	200 нМ	84,51±7,04	-	85,16±6,50	-	88,72±5,90	-	92,67±5,54	-
	25 нг/мл	25 нМ	1115,1±18,96	<0,0001	1288,02±20	0,0047	1370,52±35,28	0,8379	1269,66±50,59	0,0744
	25 нг/мл	50 нМ	962,51±23	<0,0001	1258,76±23,63	0,0003	1308,7±45,12	0,0995	1336,95±50,97	0,5871
	25 нг/мл	100 нМ	839,16±21,04	<0,0001	1162,35±23,34	<0,0001	1194,29±12,27	<0,0001	1244,96±41,03	0,0264
	25 нг/мл	200 нМ	755,65±16,88	<0,0001	1126,94±26,22	<0,0001	1151,31±20,01	<0,0001	1163,14±26,71	0,0004
IL-6	-	-	5,86±0,38							
	25 нг/мл	-	170,83±5,28 <sup>¶</sup>							
	-	200 нМ	4,70±0,32	-	4,97±0,36	-	4,98±0,28	-	5,15±0,31	-
	25 нг/мл	25 нМ	93,79±4,03	<0,0001	130,24±3,84	<0,0001	135,32±3,36	<0,0001	132,28±7,41	<0,0001
	25 нг/мл	50 нМ	69,7±2,81	<0,0001	122,69±4,36	<0,0001	128,14±6,83	<0,0001	137,61±5,87	0,0006
	25 нг/мл	100 нМ	51,01±1,57	<0,0001	111,07±4,74	<0,0001	112,13±3,37	<0,0001	122,46±5,35	<0,0001
	25 нг/мл	200 нМ	40,39±2,19	<0,0001	93,03±3,25	<0,0001	101,17±2,91	<0,0001	119,49±4,42	<0,0001

<sup>a</sup> Стимуляція TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл)

<sup>b</sup> Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка

<sup>c</sup> Статистично значущі відмінності в порівнянні зі стимуляцією тільки TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$

<sup>¶</sup> Вказує на достовірну відмінність p <0,0001 від несучого середовища (без стимуляції і без концентрації ліків)

<sup>€</sup> Вказує на достовірну відмінність p <0,1 від несучого середовища

Фіг. 1-4 ілюструють значення експресії окремих генів (MFI) для JAK1, JAK2, IL-1α і IL-6, відповідно, для кожної експериментальної репліки в кератиноцитах, модельованих TNFα і IFN-γ в присутності/відсутності інгібіторів JAK.

Білки-мішені, що становлять інтерес, в середовищі були виявлені і кількісно визначені з використанням реагентів і протоколів для мультиплексного імуноаналізу ProCarta (Invitrogen, каталожний номер EPX450-12171-901). Середовище інкубували з гранулами, кон'югованими з антитілами, призначеними для зв'язування з епітопами конкретних білків-мішеней і ідентифікації зв'язаного білка за характерним спектральним малюнком гранул. Біотинільовані детектуючі антитіла, призначені для зв'язування з різними епітопами одних і тих самих білків-мішеней, і стрептавідин-PE додають в аналітичні планшети для кількісного визначення кількості білків-мішеней. Планшети для аналізу зчитували на Luminex 200, і дані виражали як чисту середню інтенсивність флуоресценції. Чисті медіанні значення флуоресценції для стандартної кривої антигену, побудованої відповідно до процедур виробника (Invitrogen, кат. № EPX450-12171-901), наносили на графік залежно від очікуваних концентрацій для кожного стандарту. Концентрацію кожного білка екстраполювали зі стандартної кривої антигену, і концентрації виражали в пг/мл (Таблиця 5).

Таблиця 5

Концентрації медіаторів запалення, які продукуються клітинами кератиноцитів людини, стимульованими TNFα і IFNγ в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Білок	Стимуляція <sup>а</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			пг/мл <sup>б</sup>	р-величина <sup>с</sup>	пг/мл <sup>б</sup>	р-величина <sup>с</sup>	пг/мл <sup>б</sup>	р-величина <sup>с</sup>	пг/мл <sup>б</sup>	р-величина <sup>с</sup>
IL-1α	-	-	0,29±0,03							
	25 нг/мл	-	7,82±0,18*							
	-	200 нМ	0,26±0,05	-	0,29±0,03	-	0,30±0,05	-	0,31±0,04	-
	25 нг/мл	25 нМ	5,93±0,29	<0,0001	7,34±0,31	0,7043	7,74±0,36	0,9994	6,8±0,39	0,1498
	25 нг/мл	50 нМ	4,9±0,3	<0,0001	7,06±0,37	0,3281	7,01±0,39	0,3537	6,76±0,4	0,1249
	25 нг/мл	100 нМ	4,12±0,26	<0,0001	7±0,41	0,2631	7,27±0,47	0,6747	6,92±0,4	0,2281
	25 нг/мл	200 нМ	3,45±0,23	<0,0001	6,16±0,35	0,0034	6,45±0,38	0,0358	6,3±0,35	0,0121
IL-6	-	-	30,57±2,89							
	25 нг/мл	-	862,33±17,95*							
	-	200 нМ	26,86±2,62	-	28,49±2,89	-	28,79±2,91	-	28,84±1,89	-
	25 нг/мл	25 нМ	594,5±25,17	<0,0001	749,64±32,94	0,0158	774,87±31,09	0,1794	743,07±36,3	0,0476
	25 нг/мл	50 нМ	446,35±19,73	<0,0001	674,21±27,15	<0,0001	710,89±36,7	0,006	698,04±29,79	0,0037
	25 нг/мл	100 нМ	362,14±18,73	<0,0001	643,8±27,14	<0,0001	690,4±35,25	0,0016	703,99±42,22	0,0054
	25 нг/мл	200 нМ	295,21±15,22	<0,0001	568,73±24,74	<0,0001	621,79±33,44	<0,0001	646,2±32,46	<0,0001
IP-10/ CXCL10	-	-	20,14±0,36							
	25 нг/мл	-	3935,46±375,68*							
	-	200 нМ	19,75±0,42	-	19,83±0,40	-	20,23±0,48	-	20,39±0,57	-
	25 нг/мл	25 нМ	3497,56±194,81	0,6232	4068,98±507,12	0,9982	3999,39±370,53	0,9998	3903,67±366,97	>0,999

Концентрації медіаторів запалення, які продукуються клітинами кератиноцитів людини, стимульованими TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$  в присутності/відсутності інгібіторів JAK

Білок	Стимуляція <sup>a</sup>	Концентрація препарату	Сполука А		Сполука В		Сполука С		Сполука D	
			пг/мл <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	пг/мл <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	пг/мл <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>	пг/мл <sup>b</sup>	p-величина <sup>c</sup>
	25 нг/мл	50 нМ	3599,04 $\pm$ 402,58	0,7995	3872,74 $\pm$ 295,01	0,9999	3665,2 $\pm$ 277,11	0,9431	3998,62 $\pm$ 456,34	0,9999
	25 нг/мл	100 нМ	3158,24 $\pm$ 189,25	0,1574	4050,7 $\pm$ 471,31	0,999	3860,41 $\pm$ 323,05	0,9995	4100,26 $\pm$ 502,48	0,9978
	25 нг/мл	200 нМ	2662,18 $\pm$ 89,27	0,0059	4071,78 $\pm$ 411,22	0,9979	3835,78 $\pm$ 304,58	0,9984	4407,56 $\pm$ 645,63	0,8945
MIP1 $\alpha$	-	-	3,14 $\pm$ 0,24							
	25 нг/мл	-	105,63 $\pm$ 3,74*							
	-	200 нМ	2,63 $\pm$ 0,35	-	2,75 $\pm$ 0,26	-	2,90 $\pm$ 0,21	-	3,11 $\pm$ 0,28	-
	25 нг/мл	25 нМ	82,56 $\pm$ 3,1	<0,0001	103,81 $\pm$ 3,29	0,9925	101,71 $\pm$ 3,84	0,931	102,06 $\pm$ 4,18	0,9303
	25 нг/мл	50 нМ	70,57 $\pm$ 3,32	<0,0001	100,64 $\pm$ 4,66	0,7866	104,54 $\pm$ 6,56	0,9994	96,35 $\pm$ 3,57	0,3335
	25 нг/мл	100 нМ	50,91 $\pm$ 1,6	<0,0001	91,52 $\pm$ 5,05	0,0532	96,4 $\pm$ 4,18	0,4229	96,22 $\pm$ 3,58	0,3215
	25 нг/мл	200 нМ	40,36 $\pm$ 0,88	<0,0001	83,1 $\pm$ 2,77	0,0007	98,72 $\pm$ 3,87	0,6469	88,49 $\pm$ 5,06	0,016
RANTES	-	-	9,56 $\pm$ 0,56							
	25 нг/мл	-	230,17 $\pm$ 9,43*							
	-	200 нМ	10,17 $\pm$ 0,54	-	8,42 $\pm$ 0,51	-	8,61 $\pm$ 0,52	-	9,51 $\pm$ 0,56	-
	25 нг/мл	25 нМ	192 $\pm$ 12,74	0,0311	203,77 $\pm$ 12,55	0,4195	216,88 $\pm$ 13,45	0,9096	237,57 $\pm$ 17,46	0,9967
	25 нг/мл	50 нМ	165,12 $\pm$ 1,76	0,0001	198,35 $\pm$ 15,1	0,262	201,93 $\pm$ 15,44	0,439	237,55 $\pm$ 21,78	0,9967
	25 нг/мл	100 нМ	136,24 $\pm$ 7,8	<0,0001	194,21 $\pm$ 12,67	0,1736	207,79 $\pm$ 17,38	0,6354	241,39 $\pm$ 22,79	0,9841
	25 нг/мл	200 нМ	111,94 $\pm$ 6,48	<0,0001	183,18 $\pm$ 13,92	0,0416	189,62 $\pm$ 13,78	0,1403	238,51 $\pm$ 23,12	0,9942

<sup>a</sup> Стимуляція TNF $\alpha$  (25 нг/мл) і IFN $\gamma$  (25 нг/мл)

<sup>b</sup> Дані представлені як середнє значення  $\pm$  стандартна помилка

<sup>c</sup> Статистично значущі відмінності в порівнянні зі стимуляцією тільки TNF $\alpha$  і IFN $\gamma$

\* Вказує на достовірну відмінність p < 0,0001 від одного носія (без стимуляції і без концентрації препарату)

Фіг. 5 і 6 ілюструють індивідуальні концентрації білка (пг/мл) для IL-1 $\alpha$  і IL-6, відповідно, для кожної експериментальної репліки в кератиноцитах, модельованих TNF $\alpha$  і IFN- $\gamma$  в присутності/відсутності інгібіторів JAK.

5 Приклад E: Біопсія шкіри при гнійному гідраденіті характеризується підвищеною експресією кінази Януса.

10 Сумарна РНК контрольної здорової (Healthy Control) шкіри від 3 окремих донорів була придбана у Amsbio (каталожні №№ HR101 і R1234218-50). Сумарна РНК контрольної здорової (Healthy Control) шкіри з пулу донорів була придбана у Life Technologies Corporation (кат. № QS0639). Шкірні біопсії гнійного гідраденіту (41 донор) були придбані у Discovery Life Sciences у вигляді блоків, залитих у фіксований формаліном парафін (FFPE), з яких була очищена

загальна РНК.

Експресія генів зі зразків загальної РНК шкіри, взятих у здорових контролів (n=4) і хворих на гнійний гідрагеніт (n=41), була виміряна для генів, зазначених в Таблиці 6 з використанням реагентів і протоколів QuantiGene Plex Assay (Life Technologies Corporation, № в каталозі QGP-277-M19012402). Очищені РНК використовували в рекомендованому діапазоні аналізу від 50 нг до 500 нг і інкубували протягом ночі з уловлюючими гранулами, призначеними для специфічної гібридизації з мРНК від вибраних генів (Таблиця 6). Ця панель цілей включала кілька генів домашнього господарства, які використовувалися для нормалізації результатів. Після інкубації протягом ночі сигнал ампліфікували з використанням методик розгалуженої ДНК відповідно до процедур виробника (Life Technologies Corporation). Планшет для аналізу зчитували на Luminex 200, і дані виражали як чисту середню інтенсивність флуоресценції (чистий MFI). Дані були нормалізовані до середнього геометричного чистого MFI для генів домашнього господарства ACTB і GAPDH. Фіг. 7-9 ілюструють експресію генів JAK1, JAK3, TYK2, STAT1, STAT2, STAT3, IRAK1, IRAK2 і IRAK4 в шкірі здорових людей контрольної групи і суб'єктів з гнійним гідраденітом.

Таблиця 6

## Цільові гени

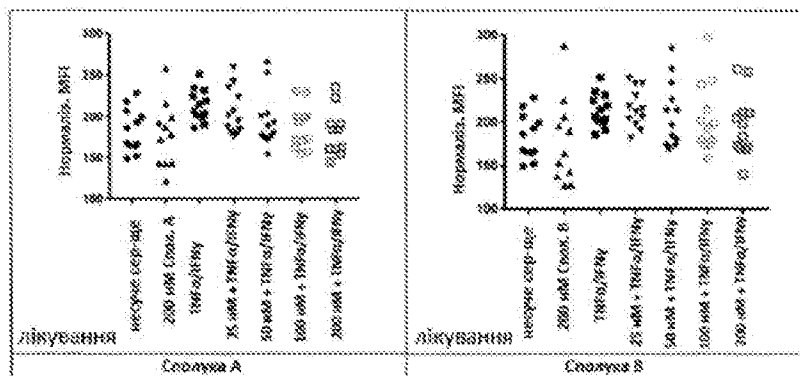
Ідентифікатор гена	Ім'я гена
JAK1	Янус кіназа 1
JAK2	Янус кіназа 2
JAK3	Янус кіназа 3
IRAK1	кіназа 1, асоційована з рецептором інтерлейкіну 1
IRAK2	кіназа 2, асоційована з рецептором інтерлейкіну 1
IRAK4	кіназа 4, асоційована з рецептором інтерлейкіну 1
STAT1	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 1
STAT3	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 3
STAT4	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 4
STAT5A	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 5A
STAT6	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 6
STAT2	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 2
STAT5B	перетворювач сигналу і активатор транскрипції 5B
TYK2	тирозинкіназа 2
SYK	тирозинкіназа, асоційована із селезінкою
GAPDH	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази
ACTB	актин бета

Різні модифікації винаходу, на додаток до описаних в цьому документі, стануть очевидними фахівцям в цій області з вищенаведеного опису. Такі модифікації також входять в обсяг формули винаходу, що додається. Кожне посилання, процитоване в цій заявці, включаючи всі патенти, заявки на патенти і публікації, повністю включене в цей документ шляхом посилання.

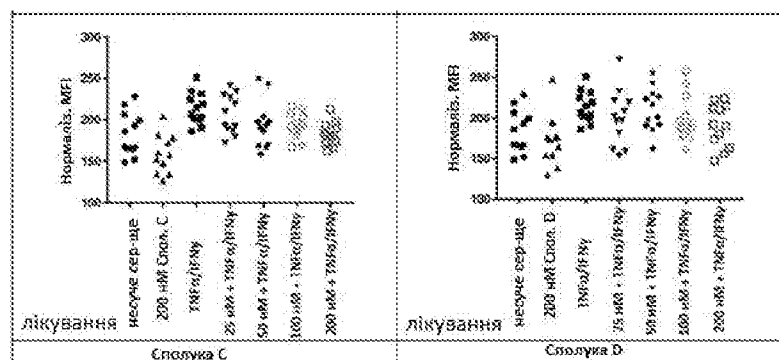
## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Спосіб лікування гнійного гідраденіту у пацієнта, що потребує цього, який включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки, яка інгібує JAK1, або її фармацевтично прийнятної солі, причому сполука являє собою:  
4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н,1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід.
- Спосіб за п. 1, де сполука або сіль є селективною щодо JAK1 порівняно з JAK2, JAK3 і TYK2.
- Спосіб за п. 2, де сполука являє собою 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н,1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензамід або його фармацевтично прийнятну сіль.
- Спосіб за п. 3, де сіль являє собою сіль фосфорної кислоти 4-[3-(ціанометил)-3-(3',5'-диметил-1Н,1'Н-4,4'-біпіразол-1-іл)азетидин-1-іл]-2,5-дифтор-N-[(1S)-2,2,2-трифтор-1-метилетил]бензаміду.
- Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де сполуку або сіль вводять у дозуванні 15, 30, 60 або 90 мг у перерахунку на вільну основу.

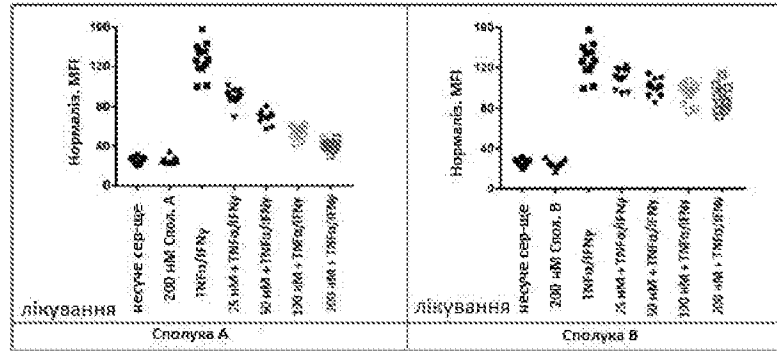
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який додатково включає введення додаткового терапевтичного агента.
7. Спосіб за п. 6, де додатковий терапевтичний агент являє собою антибіотик, ретиноїд, кортикостероїд, агент проти TNF-альфа або імунодепресант.
8. Спосіб за п. 7, де антибіотик являє собою кліндаміцин, доксициклін, міноциклін, триметоприм-сульфаметоксазол, еритроміцин, метронідазол, рифампін, моксифлоксацин, дапсон або їхню комбінацію.
9. Спосіб за п. 7, де ретиноїд являє собою етретинат, ацитретин або ізотретиноїн.
10. Спосіб за п. 7, де кортикостероїд являє собою триамцинолон, дексаметазон, флуоцинолон, кортизон, преднізон, преднізолон або флуметолон.
11. Спосіб за п. 7, де агент проти TNF-альфа являє собою інфліксимаб, етанерцепт або адалімумаб.
12. Спосіб за п. 7, де імунодепресант являє собою метотрексат, циклоспорин А, мікофенолятмофетил або мікофенолят натрію.
13. Спосіб за п. 6, де додатковий терапевтичний агент являє собою фінастерид, метформін, адапален або азелаїнову кислоту.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, де введення сполуки або солі являє собою місцеве введення.
15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, де введення сполуки або солі являє собою пероральне введення.
16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, де спосіб приводить до 10, 20, 30, 40 або 50 % покращення HiSCR (клінічна відповідь на гнійний гідраденіт).



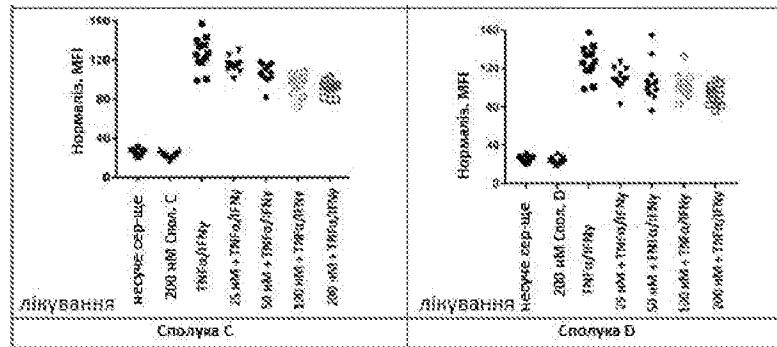
Фіг. 1



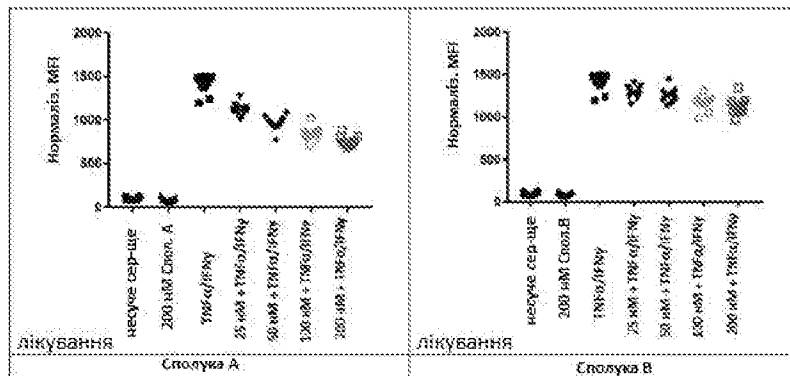
Фіг. 1 (продовження)



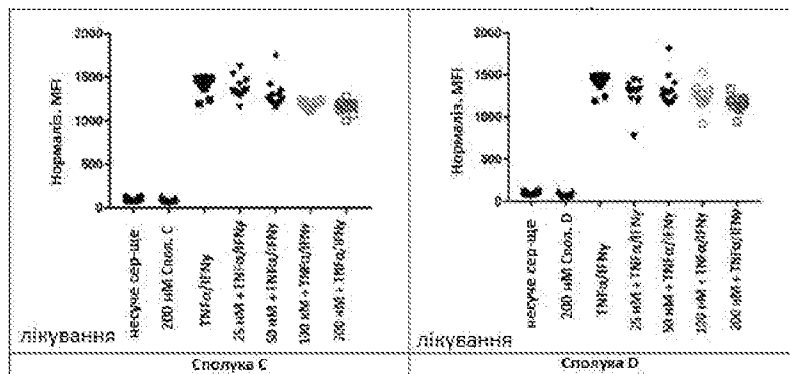
Фіг. 2



Фіг. 2 (продовження)

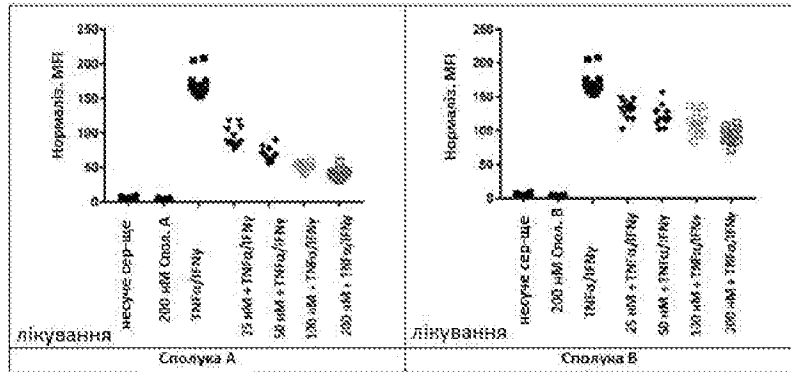


Фіг. 3

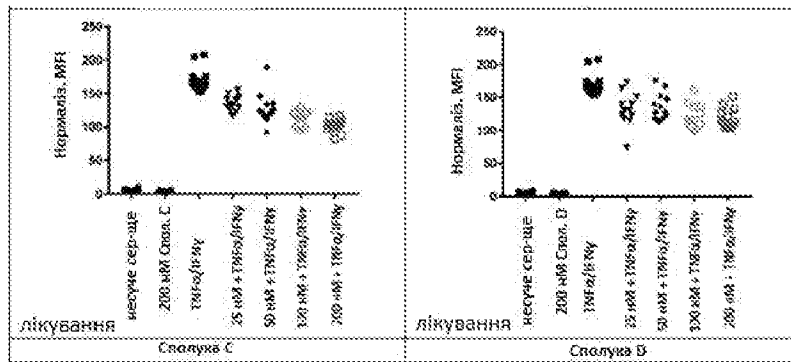


Фіг. 3 (продовження)

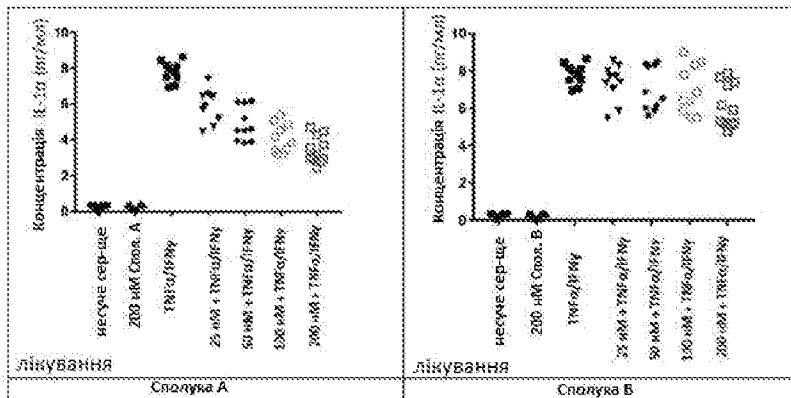




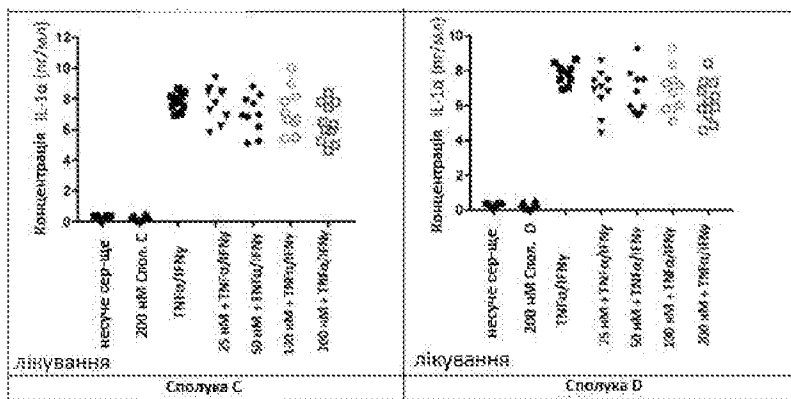
Фіг. 4



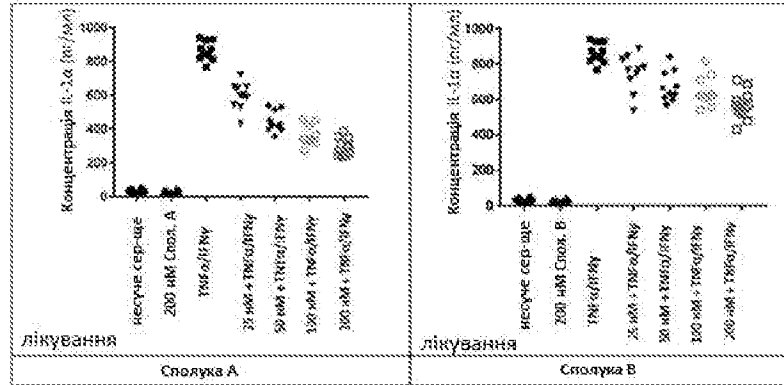
Фіг. 4 (продовження)



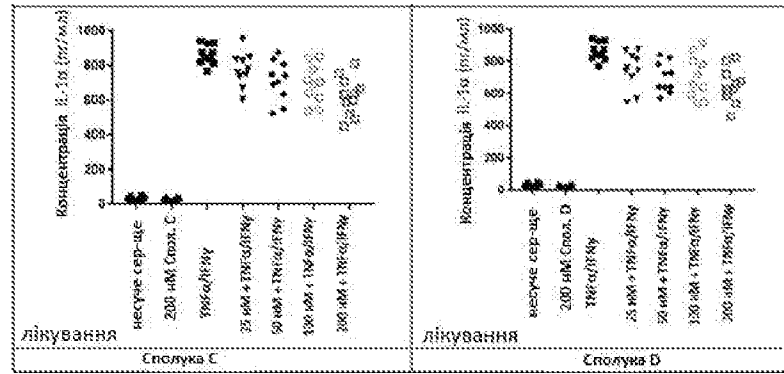
Фіг. 5



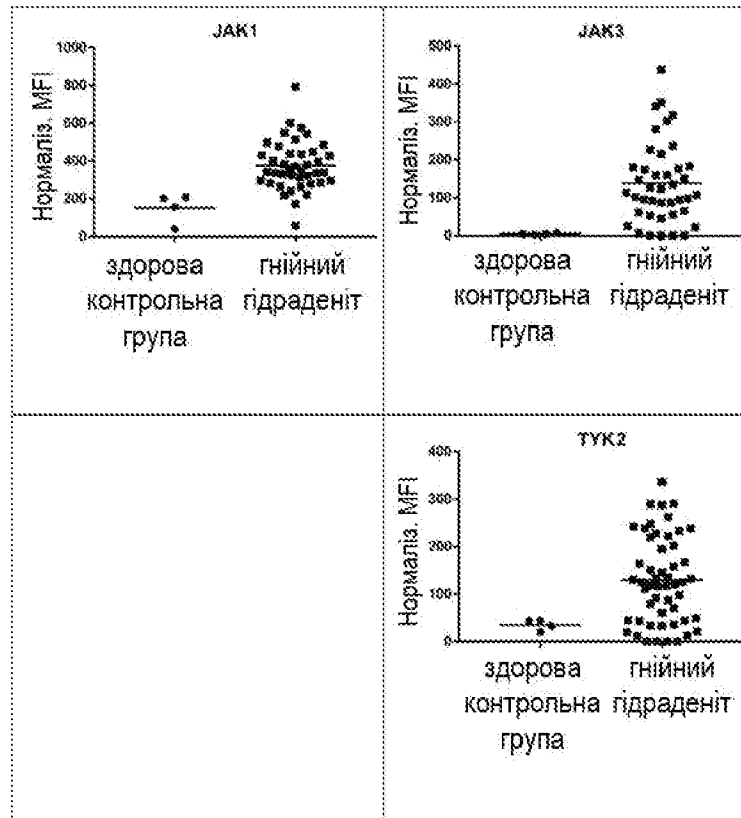
Фіг. 5 (продовження)



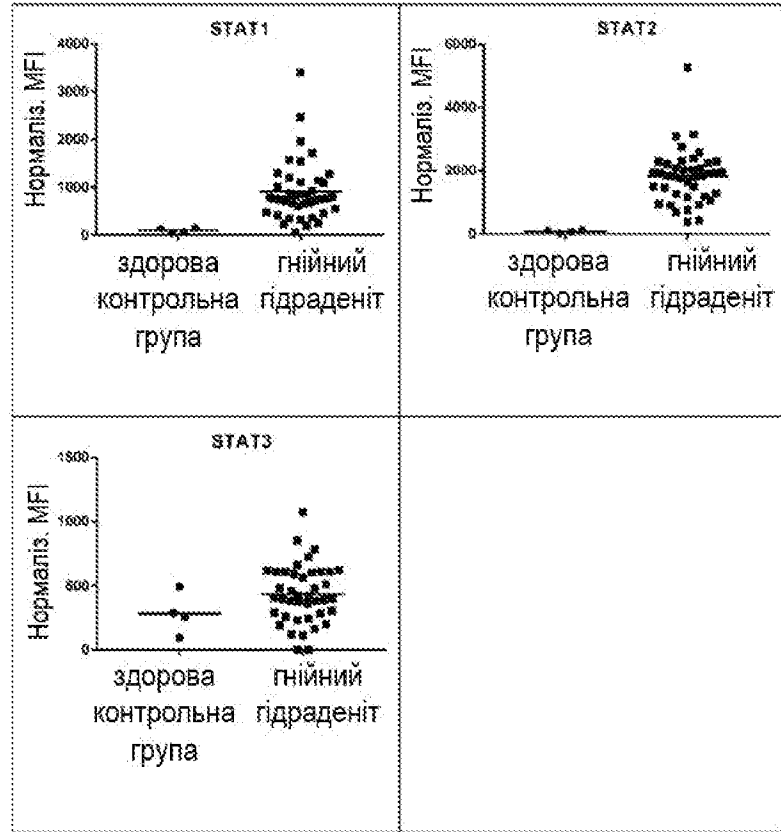
Фіг. 6



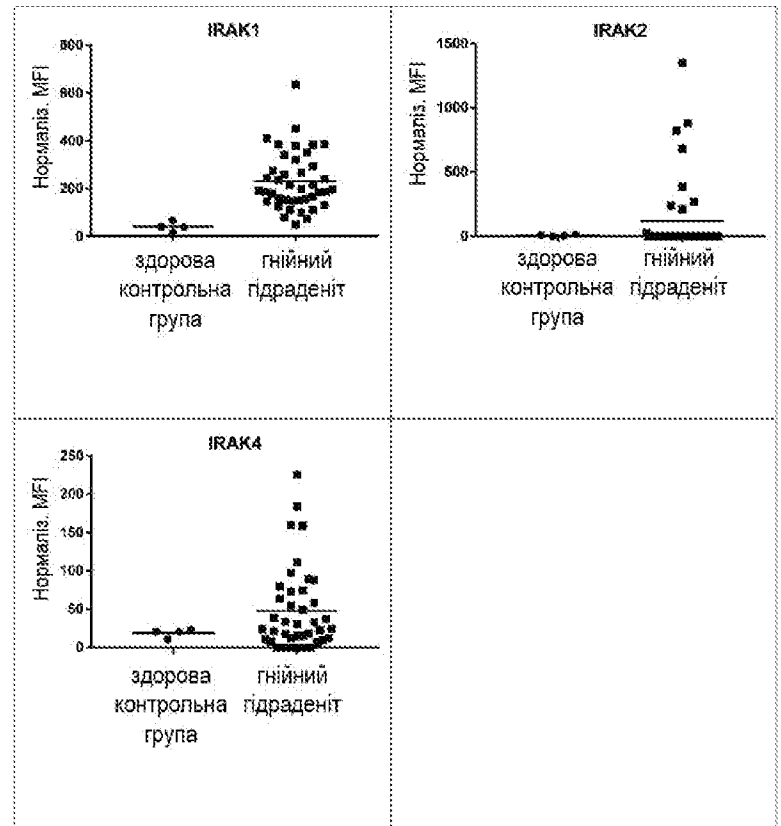
Фіг. 6 (продовження)



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

