



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0008907  
(43) 공개일자 2015년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
<i>C07D 471/04</i> (2006.01) <i>A61K 31/4155</i> (2006.01)	<b>일라이 릴리 앤드 캄파니</b>
<i>A61K 31/437</i> (2006.01) <i>C07D 401/12</i> (2006.01)	미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포레이트 센터
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)	
(21) 출원번호 10-2014-7034683	(72) 발명자
(22) 출원일자(국제) 2013년06월05일	<b>베크홀더, 티모시 폴</b>
심사청구일자 2014년12월10일	미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 폴. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
(85) 번역문제출일자 2014년12월10일	
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/044211	<b>클레이튼, 조슈아 라이언</b>
(87) 국제공개번호 WO 2013/188184	미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 폴. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
국제공개일자 2013년12월19일	
(30) 우선권주장	(74) 대리인
61/659,679 2012년06월14일 미국(US)	<b>양영준, 김영</b>

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **JAK1 및 JAK2의 억제제**

### (57) 요 약

본 발명은 JAK1 및 JAK2를 억제하고 따라서 암을 치료하는데 유용할 수 있는 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인텐-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-5-아민인 아미노 피라졸 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민인 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민인 화합물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 디히드로클로라이드인 화합물.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 염, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

### 청구항 5

암의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 염을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 암이 유방암, 폐암, 혀장 암종, 신암, 난소암, 전립선암, 두경부암, 간세포성 암종 및 결장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 화합물 또는 염.

### 청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 염.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 암이 유방암, 폐암, 혀장 암종, 신암, 난소암, 전립선암, 두경부암, 간세포성 암종 및 결장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물 또는 염.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 의약 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 JAK1 및 JAK2를 억제하고 암을 치료하는데 유용할 수 있는 아미노 피라졸 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 앤스 키나제 (JAK) 패밀리는 티로신 키나제의 군이고, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2를 포함한다. JAK 패밀리는 JAK-STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription: 신호 전달자 및 전사 활성자) 경로에 의해 시토카인-매개 신호를 세포로 전달한다. 하나의 이러한 경로, JAK-STAT3은 많은 유형의 인간 암 및 암 세포주에서 구성적으로 활성이다. 구성적으로 활성인 STAT3은 종양 세포에서 증식, 생존 및 진행을 증가시키는데 관련된다.

[0003] JAK3은 우선적으로 림프구에서 발현되고; 면역억제 효과는 JAK3 억제제에 대해 보고되어 있다. JAK3 억제제의

면역억제 활성, JAK1 및 JAK2의 억제, 및 JAK3에 대한 선택성을 고려하여, 암 요법에 사용하기 위한 JAK 억제제가 추구될 것이다.

[0004] WO 2006/087530에는 특정 피라졸 화합물이 티로신 수용체 키나제의 억제제로서 개시되어 있으며, 추가로 상기 화합물이 암의 치료에 유용한 것으로 개시되어 있다.

### 발명의 내용

[0005] 고형 종양의 치료를 위한 강력한 대안적인 JAK1/2 억제제의 제공에 대한 필요성이 존재한다. 또한, JAK3에 비해 JAK1 및 JAK2에 대해 선택적인 강력한 JAK 억제제의 제공에 대한 필요성이 존재한다. 따라서, 본 발명은 JAK1 및 JAK2의 강력한 억제제를 제공한다. 또한, 본 발명은 JAK3에 비해 JAK1 및 JAK2에 대해 선택적인 강력한 JAK 억제제를 제공한다.

[0006] 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민인 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0007] 특정한 실시양태로서, 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민인 화합물을 제공한다. 또 다른 특정한 실시양태로서, 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 디히드로클로라이드인 화합물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 디히드로클로라이드, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하며 하나 이상의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 디히드로클로라이드를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 요법에서 사용하기 위한 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 본 발명은 암의 치료에 사용하기 위한 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 본 발명은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 암을 치료하는데 사용하기 위한 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 의약의 제조에 있어서 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다. 본 발명은 암의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다.

[0013] 본 발명은 결정질 형태의 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민을 제공한다. 본 발명은 또한 2θ ± 0.2에서의 16.11, 및 4.32, 8.71, 13.12, 15.19 및 18.86 중 하나 이상에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는, 결정질 형태의 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘

-5-아민을 제공한다.

[0014] 추가로, 본 발명은 암이 유방암, 폐암, 췌장 암종, 신암, 난소암, 전립선암, 두경부암, 간세포성 암종 및 결장 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 용도의 바람직한 실시양태를 제공한다.

[0015] 상기 및 본 발명의 설명에 걸쳐 사용된 하기 용어는 달리 나타내지 않는 한 하기 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다:

[0016] "제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는 포유동물, 예를 들어 인간에게 생물학적 활성제를 전달하는데 당업계에서 일반적으로 허용되는 매질이다.

[0017] "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 상대적으로 비-독성인 무기 및 유기 염을 지칭한다.

[0018] "치료 유효량" 또는 "유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 다른 임상의에 의해 조사되는 조직, 계통, 동물, 포유동물 또는 인간에 대해 생물학적 또는 의학적 반응 또는 목적하는 치료 효과를 유도할, 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 함유하는 제약 조성물의 양을 의미한다.

[0019] 용어 "치료," "치료하다," "치료하는" 등은 장애의 진행을 늦추거나 또는 역전시키는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 이들 용어는 또한, 비록 장애 또는 상태가 실제로 제거되지 않을지라도 및 비록 장애 또는 상태의 진행 자체가 늦추어지거나 또는 역전되지 않을지라도, 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상을 경감, 완화, 약화, 제거 또는 감소시키는 것을 포함한다.

[0020] 본 발명의 화합물은 예를 들어 다수의 무기 및 유기 산과 반응하여 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 이러한 제약상 허용되는 염 및 이를 제조하기 위한 통상의 방법론은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [P. Stahl, et al., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 66, No. 1, January 1977]을 참조한다.

[0021] 본 발명의 화합물은 바람직하게는 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 사용하여 제약 조성물로서 제제화되고, 다양한 경로에 의해 투여된다. 바람직하게는, 이러한 조성물은 경구 투여를 위한 것이다. 이러한 제약 조성물 및 그의 제조 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005)]을 참조한다.

[0022] 실제로 투여되는 본 발명의 화합물의 양은 치료할 상태, 선택된 투여 경로, 투여되는 본 발명의 실제의 화합물 또는 화합물들, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 및 환자의 증상의 중증도를 비롯한 관련 상황 하에 의사에 의해 결정될 것이다. 1일 투여량은 통상적으로 약 0.1 내지 약 300 mg 범위 내이다. 일부 경우에는 상기 언급된 범위의 하한치 미만의 투여량 수준이 훨씬 더 충분할 수 있으나, 다른 경우에는 훨씬 많은 용량이 사용될 수 있다. 투여량 수준은 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0023] 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 당업계에 공지된 다양한 절차 뿐만 아니라 하기 실시예에 기재된 것들에 의해 제조될 수 있다. 기재된 경로 각각에 대한 구체적인 합성 단계는 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제조하기 위해 다양한 방식으로 조합될 수 있다.

[0024] 시약 및 출발 물질은 일반적으로 당업자에게 용이하게 입수 가능하다. 다른 것들은 유기 및 헤테로시클릭 화학의 표준 기술, 공지된 구조적으로 유사한 활성 화합물 및 전구약물의 합성과 유사한 기술, 및 임의의 신규 절차를 비롯한 하기 실시예에 기재된 절차에 의해 제조될 수 있다. 본원에 예시된 화합물은 ACDLABS 또는 시믹스 드로우(Symyx Draw) 3.2를 사용하여 명명되고 넘버링된다.

[0025] 실시예 1의 화합물은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-5-아민 디히드로클로라이드로 명명되고; 또한 3H-이미다조[4,5-b]피리딘-5-아민, 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-, 디히드로클로라이드로 명명될 수 있으며; 다른 명칭이 실시예 1의 화합물을 명백하게 확인하는데 사용될 수 있다. 실시예 2의 화합물은 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-5-아민으로 명명되고; 또한 3H-이미다조[4,5-b]피리딘-5-아민,

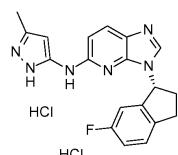
3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-로 명명될 수 있으며; 다른 명칭이

실시예 2의 화합물을 명백하게 확인하는데 사용될 수 있다.

[0026] 본원에 사용된 하기 용어는 하기 나타낸 의미를 갖는다: "DMEA"는 디메틸에탄올아민을 지칭하고; "DMF"는 디메틸포름아미드를 지칭하고; "DMSO"는 디메틸솔포시드를 지칭하고; "EtOAc"는 에틸 아세테이트를 지칭하고; "EtOH"는 에탄올을 지칭하고; "ee"는 거울상이성질체 과잉률을 지칭하고; "EDTA"는 에틸렌디아민테트라아세트산을 지칭하고; "GC/MS"는 기체 크로마토그래피에 이은 질량 분광분석법을 지칭하고; "LC"는 액체 크로마토그래피를 지칭하고; "LC/MS"는 액체 크로마토그래피에 이은 질량 분광분석법을 지칭하고; "MeOH"는 메탄올을 지칭하고; "MS"는 질량 분광분석법을 지칭하고; "NMR"은 핵 자기 공명을 지칭하고; "PBS"는 포스페이트 완충 염수를 지칭하고; "TLC"는 박층 크로마토그래피를 지칭하고; "UV"는 자외선을 지칭하고; "XRD"는 X선 회절을 지칭한다.

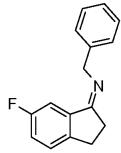
[0027] 실시예 1

[0028] 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-5-아민  
디히드로클로라이드



[0029]

[0030] 단계 1: 벤질-(6-플루오로인단-1-일리덴)-아민



[0031]

[0032] 6-플루오로인단-1-온 (14.57 g, 97.04 mmol) 및 벤질아민 (10.60 mL, 97.04 mmol)을 톨루엔 (75 mL) 중에서 협하였다. p-톨루엔술폰산 1수화물 (0.923 g, 4.85 mmol)을 첨가하였다. 환류 응축기를 부착하고, 혼합물을 질소 하에 가열하여 6시간에 걸쳐 환류한 다음, 실온에서 14시간 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트 및 물로 추출하였다. 생성된 유기부를 황산마그네슘으로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 표제 화합물을 적색 오일 (23.22 g, 100%)로서 수득하였다. MS (ES) m/z = 240 [M+1].

[0033]

단계 2: 벤질-(6-플루오로인단-1-일)-아민

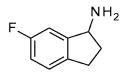


[0034]

[0035] 벤질-(6-플루오로인단-1-일리덴)-아민 (23.22 g, 97.03 mmol)을 에탄올 (1200 mL) 중에 용해시켰다. 혼합물을 0°C로 질소 하에 냉각시켰다. 수소화붕소나트륨 (11.01 g, 291.10 mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 1시간 후, 디클로로메탄 (150 mL) 및 물 (150 mL)을 첨가하였다. 14시간 동안 질소 하에 교반하고, 진공 하에 농축시켜 에탄올을 제거하였다. 잔류물을 디클로로메탄 및 포화 수성 염화나트륨으로 추출하였다. 생성된 유기부를 황산마그네슘으로 건조시키고, 여과하고, 진공 하에 농축시켜 표제 화합물을 적색 오일 (22.12 g, 94%)로서 수득하였다. MS (ES) m/z = 242 [M+1].

[0036]

단계 3: 6-플루오로인단-1-일아민



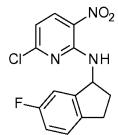
[0037]

[0038] 고압 플라스크에, 에탄올 (100 mL) 중의 10% 탄소상 팔라듐 (1.44 g)을 첨가하였다. 에탄올 (200 mL) 중 벤질-(6-플루오로인단-1-일)-아민 (14.44 g, 59.84 mmol)의 용액을 첨가하였다. 챔버를 질소로 3회, 및 이어서 수소로 3회 펴징하였다. 수소 (60 psi) 하에 50°C에서 2시간 동안 격렬히 교반하였다. 혼합물을 셀라이트(Celite)

⑧ 521을 통해 여과하고, 고체를 메탄올로 세척하였다. 여과물 진공 하에 농축시켜 표제 화합물을 터갈색 액체 (9.14 g, 100%)로서 수득하였다. MS (ES)  $m/z$  = 152 [M+1].

[0039]

단계 4: 6-클로로-N-(6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인텐-1-일)-3-니트로페리딘-2-아민



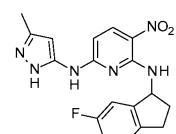
[0040]

[0041]

6-플루오로인단-1-일아민 (8.50 g, 56.22 mmol)을 메탄올 (200 mL) 및 트리에틸아민 (8.62 mL, 61.84 mmol) 중에 용해시켰다. 2,6-디클로로-3-니트로페리딘 (10.85 g, 56.22 mmol)을 첨가하고, 질소 하에 14시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 고체를 메탄올 및 헥산으로 세척하여 표제 화합물을 황색 고체 (9.00 g, 52%)로서 수득하였다. MS (ES)  $m/z$  = 308 [M+1].

[0042]

단계 5: N2-(6-플루오로인단-1-일)-N6-(5-메틸-2H-페라졸-3-일)-3-니트로페리딘-2,6-디아민



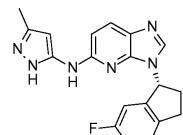
[0043]

[0044]

6-클로로-N-(6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인텐-1-일)-3-니트로페리딘-2-아민 (9.00 g, 29.34 mmol) 및 3-아미노-5-메틸페라졸 (4.56 g, 46.95 mmol)을 디메틸су포시드 (60 mL) 중에서 혼합하였다. N,N-디이소프로필에틸아민 (8.18 mL, 46.95 mmol)을 첨가하고, 반응물을 질소 하에 120°C에서 90분 동안 가열하였다. 반응물을 빙수 (200 mL)에 끊고, 20분 교반한 다음, 여과하였다. 수득한 고체를 디클로로메탄 및 메탄올의 혼합물 중에 혼탁시키고, 40°C에서 20분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하여 표제 화합물을 황색 고체 (6.03 g, 56%)로서 수득하였다. MS (ES)  $m/z$  = 369 [M+1].

[0045]

단계 6: 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인텐-1-일]-N-(3-메틸-1H-페라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-5-아민



[0046]

[0047]

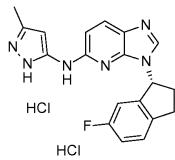
N2-(6-플루오로인단-1-일)-N6-(5-메틸-2H-페라졸-3-일)-3-니트로페리딘-2,6-디아민 (0.571 g, 1.55 mmol)을 메탄올 (10 mL) 중에 용해시켰다. 인듐 (0.890 g, 7.75 mmol) 및 염산 (12N, 0.65 mL, 7.75 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 질소 하에 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 ⑧ 521을 통해 여과하고, 고체를 메탄올로 세척하였다. 여과물을 진공 하에 농축시키 조 N2-(6-플루오로인단-1-일)-N6-(5-메틸-2H-페라졸-3-일)-페리딘-2,3,6-트리아민 디히드로클로라이드를 수득하였다.

[0048]

N2-(6-플루오로인단-1-일)-N6-(5-메틸-2H-페라졸-3-일)-페리딘-2,3,6-트리아민 디히드로클로라이드를 아세트산 (5 mL) 및 트리메틸 오르토포르메이트 (0.68 mL, 6.20 mmol) 중에 용해시켰다. 질소 하에 30분 동안 교반하였다. 진공 하에 농축시키고, 아세토니트릴 중의 0.03% 수성 염산의 구배로 용리하면서 역상 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물 (0.124 g, 19%, 2 단계)의 라세미체를 수득하였다. MS (ES)  $m/z$  = 349 [M+1]. 라세미체를 키랄 크로마토그래피 조건으로 분리하여 표제 화합물 (70 mg, 11%. 거울상이성질체 1 (3.7분에서의 제1 용리) > 99% ee, 100% MeOH, 0.2% DMEA, 1.0 mL/분, 4.6 x 150 mm, 키랄팩(CHIRALPAK) ⑧ AD-H)을 수득하였다.

[0049]

단계 7: 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인텐-1-일]-N-(3-메틸-1H-페라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-5-아민 디히드로클로라이드



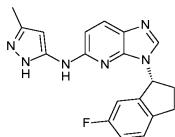
[0050]

3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민 (0.070 g, 0.201 mmol)을 디클로로메탄 (5 mL) 중에 용해시켰다. 1,4-디옥산 중의 염화수소 4 M (0.100 mL, 0.400 mmol)을 첨가하였다. 용액을 14시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 농축 건조시켰다. 메탄을 중에 용해시키고, 진공 하에 3회 농축 건조시켜 표제 화합물 (0.067 g, 79%)을 수득하였다. MS (ES) m/z = 349 [M+1].

[0052]

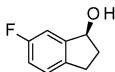
실시예 2

3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-피라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-5-아민



[0054]

단계 1: (1S)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-올



[0056]

22L 4구 둑근 바닥 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 1L 및 5L 첨가 깔때기, 냉각 조 및 질소 유입구를 장착하였다. 질소 퍼징 하에, 플라스크를 6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-온 (500 g, 3.33 mol) 및 툴루엔 (5 L)으로 충전하였다. 생성된 혼합물을 5분 동안 교반하여 모든 고체를 용해시킨 다음, 얼음/아세톤 조를 사용하여 -10°C로 냉각시켰다. 1 L 첨가 깔때기를 R-(-)-2-메틸-CBS-옥사자보를리딘 (툴루엔 중 1M, 666 mL, 0.666 mol)으로 충전하였다. 상기 용액을 반응 혼합물에 첨가한 다음, 5분 동안 교반하였다. 5 L 첨가 깔때기를 툴루엔 (5 L)에 이어서 보란-메틸 술피드 복합체 (310.1 mL, 3.33 mol)로 충전하였다. 깔때기를 와류시켜 시약을 혼합한 후, 포트 온도를 -5°C 미만으로 유지하면서 이 용액을 반응 혼합물에 3시간에 걸쳐 적가하였다. 15분 후에, 반응의 샘플을 TLC (25 μL 반응 혼합물을 50 μL MeOH로 켄칭함; 75/25 헥산/EtOAc, UV)에 의해 모니터링하였다. 이 분석은 출발 물질이 잔류하지 않는 것을 나타내었다. 혼합물을 냉각 조 내에서 밤새 교반되도록 하였다.

[0058]

반응 혼합물을 10°C로 냉각시키고, 메탄올 (0.5 L)을 첨가 깔때기에 충전한 다음, 30분에 걸쳐 적가하였다. 가스-배출은 MeOH 켄칭 시작의 증거였지만, 첨가의 ~1/3 후 진정되었다. 생성된 혼합물을 15분 동안 교반한 다음, 포화 NaCl (2.5 L)로 희석하였다. 20분 동안 교반한 후, 혼합물을 하이플로 슈퍼 셀(Hyflo Super Cel) ®의 패드를 통해 여과하고, 패드를 툴루엔 (2 L)으로 세정하였다.

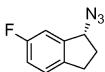
[0059]

여과물을 저부 유출구 플라스크로 옮기고, 층을 분리하였다. 유기부를 탈이온수 (2.5 L), 1N HCl (2.5 L), 포화 NaHCO<sub>3</sub> (2.5 L) 및 포화 NaCl (2.5 L)로 세척하였다. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 kg)를 통해 다르코(Darco) (0.5 kg)의 존재 하에 0.5시간 동안 건조시킨 후, 혼합물을 키젤겔(Kieselgel) 60 실리카 (0.5 kg)로 토펑된 하이플로 슈퍼 셀®을 통해 여과하였다. 패드를 툴루엔 (1L)으로 세정하고, 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 생성된 오일을 사전에 제조된 고체로 시딩하여 결정화를 유도하였다. 결정화로 표제 화합물을 연황색 고체 (500g, 98.7%, 98.1% ee)로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500.0 MHz): δ 1.74 (bs, 1H), 1.99 (m, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.77 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 6.95 (td, 1H), 7.09 (dd, 1H), 7.17 (td, 1H) ppm.

[0060]

단계 2: (1R)-1-아지도-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴



[0062]

22 L 3구 플라스크에 오버헤드 교반기, 열전쌍, 질소 유입구, 1 L 첨가 깔때기 및 냉각 조를 장착하였다. 플라

스크를 (1S)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-올 (700 g, 4.6 mol) 및 툴루엔 (7 L)으로 충전하였다. 생성된 용액을 0~5°C로 냉각시키고, 디페닐포스포릴 아지드 (1444 g, 5.1 mol)를 한번에 첨가하였다. 15분 후, 1,8-디아자비시클로[5.4.0]-운데스-7-엔 (847 mL, 5.5 mol)을 첨가 깔때기에 충전한 다음, 포트 온도를 10°C 미만으로 유지하면서 반응 용기를 2시간에 걸쳐 적가하였다. 조를 제거하고, 반응 혼합물을 밤새 주위 온도에서 교반되게 하였다.

[0064]

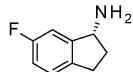
22시간 후, TLC (80/20 헥산/EtOAc, UV) 및 GC/MS는 반응이 완결된 것을 나타내었다. 탈이온수 (3.5 L)를 15분에 걸쳐 첨가하고, 15분 동안 교반하였다. 혼합물을 저부 유출구 플라스크로 옮기고, 층을 분리하였다. 유기부를 탈이온수 (3.5 L), 이어서 0.5 M HCl (3.5 L), 및 최종적으로 탈이온수 (3.5 L)로 세척하였다. 3종의 수성 세척액을 합하고, 툴루엔 (3.5 L)으로 역추출하였다. 유기부를 합하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 kg)를 통해 다르코 (0.5 kg)의 존재 하에 건조시켰다. 15분 동안 교반한 후, 혼합물을 하이플로 슈퍼 셀®의 패드로 토팡된 GFF 종이를 통해 여과하였다. 패드를 툴루엔 (1 L)으로 세정하고, 여과물을 22L 뷔히(Buechi) 플라스크로 옮기고, 진공 하에 ~ 4 부피 (2.8 L)로 농축시켰다.

[0065]

큰 깔때기를 실리카 젤 플러그 크로마토그래피에 셋업하고, 키겔겔 60 실리카 (6 Kg)로 충전하였다. 실리카를 모래 (1 Kg)로 토팡하고, 툴루엔으로 습윤화하였다. 조 생성물을 함유하는 반응 용액 2.8 L를 깔때기에 약간의 진공 하에 부었다. 생성물을 툴루엔 (4 x 4L)으로 용리하였다. 여과물을 청량한 플라스크로 옮기고, 진공 하에 (40°C 조) 약 3 L (툴루엔 용액 2788g)로 농축시켰다. 소량 샘플 중량 분석 (툴루엔 용액 0.467g 중의 표제화합물 0.123g)을 기준으로 하여, 표제 화합물 753.5g (툴루엔 중 7782 g 용액, 90.2% 수율)이 존재하였다. 툴루엔 용액을 갤런 저그로 옮기고, 후속 단계에서의 사용을 위해 냉장고에 보관하였다.

[0066]

단계 3: (1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-아민

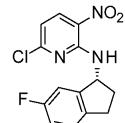


[0067]

3-갤런 히드로 탱크 T-85를 5% Pd/C (164 mL 툴루엔 중 8.2g) 및 단계 2에서 수득한 (1R)-1-아지도-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴 (에탄올 용액 2594 g 중 163.9 g 아지드)의 1/3로 충전하였다. 탱크를 질소로 펴징한 다음, 수소 (~50 psi)로 가압하였다. 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 이어서, 탱크를 배기시키고, 수소 (~50 psi)로 재충전하고, 추가 30분 동안 교반하였다. TLC 및 GC/MS는 반응이 완결된 것을 나타내었다. 반응 혼합물을 카보이로 옮기고, 탱크를 3A-EtOH로 세정하였다. 반응을 동일한 규모에서 2회 반복하였다. 3종의 반응 용액을 합하였다. 감압 하에 약 8 부피로 농축시켰다. 혼합물을 GFF 종이에 의해 여과하여 촉매를 제거하고, 패드를 3A-EtOH (~ 200 mL)로 세정하였다. 소량 샘플 분석을 기준으로 하여, 표제 화합물을 3A-EtOH 용액에서 92% 수율 (386 g)로 수득하였다.

[0069]

단계 4: 6-클로로-N-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-3-니트로페리딘-2-아민

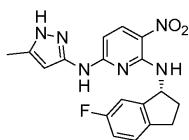


[0070]

12 L 3구 플라스크를 질소로 펴징한 다음, 맨틀 및 응축기를 가열하면서 열전쌍을 어셈블링하였다. (1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-아민 (386 g, 2.55 mol)을 플라스크로 충전하고, 3A-EtOH (3.9 L), 디이소프로필에틸아민 (1.34 L, 7.68 mol) 및 2,6-디클로로-3-니트로페리딘 (643 g, 3.07 mol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 8시간 동안 교반한 다음, 70°C로 12시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 8°C로 1.25시간에 걸쳐 냉각시킨 다음, 폴리프로필렌 패드 상에서 여과하였다. 고체를 3A-EtOH (760 mL)로 세척하고, 청량한 접시로 옮기고, 추가로 진공 오븐 (45°C)에서 건조시켜 표제 화합물을 오렌지색 고체 (786 g, 71%, 98.0% ee)로서 수득하였다. GC/MS (m/z): 307 (M<sup>+</sup>).

[0072]

단계 5: N2-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N6-(5-메틸-1H-페라졸-3-일)-3-니트로페리딘-2,6-디아민

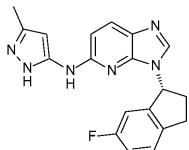


[0073]

[0074] 3구 플라스크 (22 L)에 열전쌍, 응축기, 오버헤드 교반기, N<sub>2</sub> 유입구 및 가열 맨틀을 장착하였다. 플라스크에, 6-클로로-N-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-3-니트로페리딘-2-아민 (600 g, 1.95 mol), 5-메틸-1H-페라졸-3-아민 (208.31 g, 2.14 mol), 디메틸су勖시드 (6.0 L) 및 디이소프로필에틸아민 (680.11 mL, 3.90 mol)을 충전하였다. 용액을 70°C에서 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고, 이것을 MeOH (6.0 L)로 희석하였다. 탈이온수 (2.1 L)를 상기 용액에 1시간에 걸쳐 첨가하여 오렌지색 혼탁액을 수득하였다. 혼탁액을 1시간 동안 교반한 다음, 폴리프로필렌을 통해 여과하였다. 필터 케이크를 탈이온수 (12 L)로 세척하고, 고체를 칭량한 접시로 옮기고, 일정한 중량으로 진공-건조시켜 (50°C) 표제 화합물 (647 g, 90%)을 수득하였다. MS (m/z): 369 (M+1).

[0075]

단계 6: 3-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N-(3-메틸-1H-페라졸-5-일)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-5-아민



[0076]

[0077] N2-[(1R)-6-플루오로-2,3-디히드로-1H-인덴-1-일]-N6-(5-메틸-1H-페라졸-3-일)-3-니트로페리딘-2,6-디아민 (622 g, 1.69 mol)을 10 L 둑근 바닥 플라스크에 첨가하고, 이를 DMF (5 L)로 처리하였다. 플라스크 내용물을 모든 고체가 용해될 때까지 와류시켰다. 트리메틸오르토포르메이트 (1.85 L, 16.9 mol) 및 페리디늄 p-톨루엔술포네이트 (42.4 g, 0.169 mol)를 와류시키면서 플라스크로 충전하였다. 3-갤런 히드로 탱크 T-85를 5% Pd/C (93.3 g, 15 중량% 로딩)로 DMF (100 mL) 중의 농후한 슬러리로서 질소 퍼징 하에 충전하였다. 상기 혼합물을 히드로 탱크로 첨가하고, 질소로 여러 번 퍼징한 다음, 탱크를 수소 (~50 psi) 하에 충전하였다. 혼합물을 60 °C로 가열하고, 밤새 교반되도록 하였다. 약 22시간에서, 반응기를 배기시키고, 샘플을 취하고, TLC 및 LC/MS에 의해 확인하였으며, 이들 둘 다는 반응이 완결된 것을 나타내었다. 혼합물을 하이플로 슈퍼 셀®의 패드를 통해 여과하고, 탱크 및 패드를 EtOAc (1 L)로 세정하였다. 여과물을 뛰히 플라스크로 옮기고, 탈이온수 (622 mL)로 희석하고, 진공 하에 (50°C 조) 농축시켜 과량의 트리메틸오르토포르메이트를 제거하였다. DMF 용액을 50 L 저부 유출구 플라스크로 옮기고, EtOAc (12.4 L)로 희석하였다. 용액을 포화 LiCl 용액 (3 x 6.22 L)으로 세정하였다. 수성 세척액을 합하고, EtOAc (4 x 3.11 L)로 역추출하였다. 유기부를 합하고, 포화 LiCl (2 x 1 L)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, GFF 종이를 통해 여과하였다. 여과물을 진공 하에 (45°C 조) 농축시켜 조 생성물을 녹색 고체 (609 g, 103.5%)로서 수득하였다.

1H NMR (DMSO-d6, 500.0

MHz): δ 2.15 (s, 3H), 2.67 (q, 2H), 2.99 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 5.89 (s, 1H), 6.11 (t, 1H),  
6.76 (dd, 1H), 6.87 (d, 1H), 7.10 (td, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.99 (s, 1H), 9.23  
(bs, 1H), 11.65 (bs, 1H) ppm.

[0078]

[0079] 3구 플라스크 (22L)에 열전쌍, 응축기, 오버헤드 교반기, N<sub>2</sub> 유입구 및 가열 맨틀을 장착하였다. 플라스크에, 상기 직접 제조한 조 물질 (598.5 g, 1.7 mol) 및 아세토니트릴 (12 L)을 충전하고, 생성된 혼합물을 가열하여 환류시켰다. 완전 용액을 수득하자 마자, 열원을 정지하고, 용액을 자체-냉각되도록 하였다. 상기 용액을 상기로부터의 녹색 고체로 56°C에서 시딩하고, 결정화가 즉시 시작되었으며; 초기 시드 물질은 본질적으로 상기와 같이 수득하였다. 혼탁액을 빙조를 사용하여 추가로 냉각시키고, 밤새 교반하고, 여과하였다. 생성물 케이크를 아세토니트릴 (1.2 L)로 세척하고, 고체를 칭량한 접시로 옮기고, 진공 하에 (50°C) 일정한 중량으로 건조시켜 표제 화합물 (349.54 g, 58.4%)을 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*6,

500.0 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 2.67 (q, 2H), 2.99 (m, 1H), 3.17 (m, 1H), 5.89 (s, 1H), 6.11 (t, 1H), 6.76 (dd, 1H), 6.87 (d, 1H), 7.10 (td, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.99 (s, 1H), 9.23 (bs, 1H), 11.65 (bs, 1H) ppm.

[0080]

## X선 분말 회절

결정질 고체의 XRD 패턴을, CuKa 공급원 ( $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ ) 및 반텍(Vantec) 검출기가 장착되어 있으며 35 kV 및 50 mA에서 작동하는 브루커 D4 엔데버(Bruker D4 Endeavor) X선 분말 회절계 상에서 수득하였다. 이 샘플을,  $2\theta$ 에서의  $0.0087^\circ$ 의 단계 크기 및 0.5 초/단계의 스캔 속도를 사용하고 0.6 mm 발산 슬릿, 5.28mm 고정된 산란방지 슬릿 및 9.5 mm 검출기 슬릿을 사용하여  $2\theta$ 에서의 4 내지  $40^\circ$ 에서 스캐닝하였다. 건조 분말을 석영 샘플 홀더 상에 패킹하고, 유리 슬라이드를 사용하여 평활면을 수득하였다. 임의의 주어진 결정 형태에 대해, 결정 형태 및 습성과 같은 인자에 기인하는 바람직한 배향으로 인해 회절 피크의 상대 강도가 달라질 수 있다는 것이 결정학계에 널리 공지되어 있다. 바람직한 배향의 효과가 존재하는 경우에, 피크 강도는 변경되지만, 다형체의 특징적인 피크 위치는 변하지 않는다. 게다가, 임의의 주어진 결정 형태에 대해, 각 피크 위치가 약간씩 달라질 수 있다는 것이 결정학계에 또한 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 샘플이 분석되는 온도 또는 습도의 변경, 샘플 고체, 또는 내부 표준의 존재 또는 부재로 인해 피크 위치가 이동할 수 있다. 본 발명의 경우에,  $2\theta$ 에서의 ± 0.2의 피크 위치 가변도는 지시된 결정 형태의 명백한 확인을 방해하지 않으면서 이들 잠재적인 변경을 고려할 것이다. 결정 형태의 확인은 구별되는 피크 ( $2\theta$ 의 단위), 전형적으로 보다 우세한 피크의 임의의 특유한 조합에 기반하여 이루어질 수 있다. 주위 온도 및 상대 습도에서 수집된 결정 형태 회절 패턴을 8.85 및 26.77 도 2-세타에서 NIST 675 표준 피크를 기준으로 조정하였다.

[0083]

따라서, 실시예 2의 제조된 샘플을 하기 표 1에 기재된 바와 같은 회절 피크 (2-세타  $\text{\textcircum}$ )를 갖는 CuKa 방사선을 사용하여 XRD 패턴에 의해 특성화하였다. 구체적으로, 패턴은 0.2 도의 회절각에 대한 허용 오차로 16.11에서의 피크를 4.32, 8.71, 13.12, 15.19 및 18.86으로 이루어진 군으로부터 선택된 피크 중 1개 이상과 함께 함유 한다.

[0084]

<표 1> 실시예 2의 X선 분말 회절 피크.

피크	각도(2-세타 $\text{\textcircum}$ )	강도(%)
1	4.32	30
2	6.95	19
3	8.71	23
4	12.21	14
5	13.12	34
6	13.29	23
7	15.19	48
8	16.11	100
9	17.66	20
10	18.86	62
11	18.98	46
12	19.49	74
13	20.25	35
14	21.94	16
15	24.02	33

[0085]

## JAK1/2/3 시험관내 효소 검정

[0087]

JAK 랜타스크린(LanthaScreen)<sup>TM</sup> 키나제 검정 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), #PV4844)을 사용하여 JAK1, JAK2 및 JAK3 키나제에 대한 화합물  $IC_{50}$  값을 결정하였다. 이 키나제 검정은 공여자 종으로서 수명이 긴 테르븀 (Tb) 표지된 항체를, 및 수용자 종으로서 녹색 형광 단백질-신호 전달자 및 전사 활성자 (GFP-STAT1)를 사용하는 시간 분해 형광 공명 에너지 전달 (TR-FRET) 검정 포맷이다.

[0088]

TR-FRET 비를 사용하여 JAK1, JAK2 또는 JAK3 활성을 모니터링하였으며, 여기서 GFP-STAT1의 인산화의 증가는 TR-FRET 비의 증가를 초래하였다. 얇은 흑색 384-웰 프록시플레이트(Proxiplate) (퍼킨엘머(PerkinElmer), #6008260) 내에서 12.5 마이크로리터 반응 부피를 사용하여 키나제 반응을 수행하였다. 시약을 첨가하여 50 밀리몰 N-2-히드록시에틸페라진-N-2'-에탄술폰산 (HEPES) pH 7.3, 1.76 밀리몰 트리톤(Triton)<sup>TM</sup> X-100, JAK1 검정용 20.0 마이크로몰 아데노신 트리포스페이트 (ATP) (JAK2 검정용 5 마이크로몰 ATP, 또는 JAK3 검정용 2

마이크로몰 ATP), 10.0 밀리몰 염화마그네슘 ( $MgCl_2$ ), 1 밀리몰 에틸렌 글리콜 테트라아세트산 (EGTA), 0.01% 브리즈(Brij)-35, 0.05 마이크로몰 녹색 형광 단백질-신호 전달자 및 전사 활성자 (GFP-STAT1), 14 나노몰 JAK1 효소 (또는 1.0 나노몰 JAK2 효소 또는 2.5 나노몰 JAK3 효소), 및 4% 디메틸су포시드 및 실시예 1의 화합물의 연속 희석물 (20,000 나노몰로부터 1 나노몰로 1:3 희석함)의 최종 반응 조건을 수득하였다. ATP/GFP-STAT1 첨가 후, 검정 플레이트를 1분 동안 1000 분당 회전수 (RPM)에서 원심분리하였다. 플레이트를 실온에서 60분 동안 인큐베이션되게 한 다음, 20 밀리몰 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 2 나노몰 Tb-항-pSTAT1[pTyr701], 0.67 밀리몰 트리스(히드록시메틸)아미노에탄 히드로클로라이드 (트리즈마(Trizma)®) pH 7.5, 0.02% 아지드화나트륨 및 0.01% 노닐페닐폴리에틸렌 글리콜 (노니데트(Nonidet) ® P40)을 함유하는 정지 완충제 12.5 마이크로리터를 첨가하여 정지하였다. 실온에서 90분 동안 인큐베이션하고, 엔비전(EnVision) 플레이트 판독기 (퍼킨엘머, #2104-0010)에서 340 nm 파장 여기 필터, 및 520 nm 및 495 nm 파장의 방출 필터를 사용하여 판독하였다. 520 나노미터에서 측정된 GFP-STAT1에 대한 방출 파장 대 Tb-항-pSTAT1[pTyr701]에 대한 495 나노미터에서의 방출로부터 비를 유도하였다. 퍼센트 억제 데이터를 사용하여 화합물에 대한  $IC_{50}$  값을 유도하였으며, 이는 온-플레이트 대조군과 비교하여 반응 데이터로부터 계산하였다 (활성 효소 대 2.0 마이크로몰 대조군-억제된 효소). 액티비티베이스(ActivityBase) 4.0을 사용하여 퍼센트 억제 및 10-포인트 화합물 농도 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식에 대해 피팅하였다.

[0089] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기 기재된 바와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 JAK1 (n=3)에 대해 1.7 nM +/- 0.8 nM의  $IC_{50}$ , JAK2 (n=1)에 대해 1.7 nM의  $IC_{50}$ , JAK3 (n=6)에 대해 8.0 nM +/- 5.9 nM의  $IC_{50}$ 을 갖도록 결정하였다. 실시예 1의 화합물은 효소 검정에서 JAK3에 비해 JAK1 및 JAK2에 대해 4배 초과의 선택성을 증명하였다. 이러한 결과는 실시예 1의 화합물이 JAK1 및 JAK2의 강력한 시험관내 억제제이고 JAK3에 비해 JAK1 및 JAK2에 대해 시험관내 선택적인 것으로 제시하였다.

[0090] JAK2 EPO-TF 1/pSTAT5 세포-기반 검정 - 셀로믹스 어레이스캔(Celomics ArrayScan)® HCS

[0091] JAK2 EPO-TF1/pSTAT5 세포-기반 검정은 적혈구계 전구 세포에서 JAK2-STAT5의 구성적 활성화를 모방하고, 이는 진성 다혈구혈증 (PV)의 마커인 적혈구의 과다생산을 유도하였다. 따라서, EPO-TF1/pSTAT5 세포-기반 검정은 시험관내 JAK 화합물의 JAK2 세포 활성의 평가를 가능하게 하였다.

[0092] TF-1 (인간 적백혈병) 세포를 10% 태아 소 혈청 (FBS), 0.075% 중탄산나트륨, 1 mM 피루브산나트륨, 1x 항생제/항진균제 (인비트로젠(Invitrogen), 켈리포니아주 칼스베드) 및 0.45% 글루코스를 함유하는 RPMI 1640 내에서 유지하였다 (RPMI-1640은 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute)에서 무어(Moore) 등에 의해 개발됨. 제제는 비카르보네이트 완충제를 이용하고 아미노산 및 비타민의 양이 변경된 RPMI-1630 시리즈의 배지를 기재로 함.). 배지를 2 ng/mL의 최종 농도의 GM-CSF (과립구-대식세포 콜로니-자극 인자)로 보충하였다. 세포를 37°C에서 5%  $CO_2$  하에 유지하였다. 세포를 무혈청 배지 중에서 기아를 겪게 하여 내인성 성장 인자를 제거하였다. TF-1 세포를 카운팅하고, 세포를 수집하여 웨일당  $2 \times 10^5$  개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트당  $2 \times 10^7$  개의 세포를 시딩하였다. 비보충형 RPMI 1640 (0.075% 중탄산나트륨, 1 mM 피루브산나트륨, 1x 항생제/항진균제 및 0.45% 글루코스를 함유하는 RPMI 1640)을 사용하여 세포를 2회 세정한 후, 0.6% FBS를 함유하는 RPMI 중에서  $5 \times 10^5$  개 세포/mL의 최종 농도로 세포를 혼탁시켰다. 혼탁한 세포를 다시 조직 배양 플라스크에 첨가하고, 밤새 37°C에서 인큐베이션하였다. 시험 화합물을 100% DMSO 중에서 10 mM 농도로 제조하였다. 화합물을 10 포인트-200x 농도-반응 범위 (4 mM- 200 nM)로 100% DMSO를 사용하여 연속적으로 1:3 희석하였다. 개별 96 딥 웰 플레이트에서, 4x 농도 화합물 플레이트를 위해 10% FBS를 함유하는 125  $\mu$ L의 완전 RPMI 1640 배지에 2.5  $\mu$ L의 200x 화합물 용액을 첨가하였다.

[0093] 검정을 수행하기 위해, 혈청-기아 세포를 수집하고, 비보충형 RPMI 1640 배지를 사용하여 1회 세척하였다.  $8 \times 10^5$  개 세포/mL의 최종 농도를 위해 10% FBS 완전 RPMI 배지 중에 세포를 혼탁시켰다. 혼탁한 세포 ( $2 \times 10^5$  개의 세포) 250  $\mu$ L의 분취액을 4x 농도 화합물 플레이트 중 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 볼텍싱시킴으로써 혼합하고, 플레이트를 37°C 수조에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 사전에 가온시킨 10% FBS 완전 RPMI 1640 배지를 사용하여 6.4 유닛/mL의 신선한 4x 에리트로포이에틴 (EPO) 작업 용액을 제조하였다. 세포를 10분 동안 화합물로 처리한 후, 125  $\mu$ L의 EPO 배지를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 볼텍싱시켰다. 세포를 37°C 수조에서 20분 동안 인큐베이션하고, 인큐베이션 시간 동안 매 5분마다 혼합하였다. 마지막 10 포인트 농도-반응 범위는 0.5%의 DMSO 및 1.6 U/mL의 EPO의 최종 농도에서 20  $\mu$ M-1 nM이었다. 세포를 처리한 후, 500  $\mu$ L의 1%

포름알데히드 용액 (포스페이트-완충 염수 (PBS)로 새로 제조되고 37°C에서 가온 상태로 유지됨)을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 8-10회 도립시켜 혼합하였다. 플레이트를 37°C 수조에 10분 동안 두었다. 인큐베이션한 후, 세포 플레이트를 1200 rpm으로 5분 동안 실온 (RT)에서 회전시켰다. 100  $\mu$ L의 세포 ( $2 \times 10^5$  개의 세포)를 남겨둔 채로 상청액을 흡인시켰다. 세포를 볼테싱시키고, 회전 단계를 반복하고, 최종 세척 후  $\sim 2 \times 10^5$  개의 세포를 함유하는 100  $\mu$ L를 남겨두면서, 800  $\mu$ L의 PBS를 사용하여 2회 세척하였다. 차가운 90% 메탄을 800  $\mu$ L의 분취액을 세포에 첨가하고, -20°C에서 밤새 두었다. 플레이트를 회전시키고, 메탄을 제거하였다. 세포를 FACS 완충제 (5% FBS 및 0.02% 아지드화나트륨을 함유하는 PBS)를 사용하여 세척하였다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 완충제 중 마우스 항-pSTAT5 (pY694) 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647®의 1:10 희석액 200  $\mu$ L의 분취액을 세포에 첨가하였다. 세포를 잘 혼합하고, 실온에서 2시간 동안 어둠에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 100  $\mu$ L의 세포를 남겨두었다. 2  $\mu$ g/mL 휙스트(Hoechst) (아크로스 오르가닉스(Acros Organics), 뉴저지주 모리스 플레이스)의 작업 용액을 PBS를 사용하여 제조하였다. 분취액 200  $\mu$ L를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 실온에서 10분 동안 어둠에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 50  $\mu$ L의 시토фикс(Cytofix) (BD 바이오사이언스(BD Biosciences), 캘리포니아주 산호세)를 세포에 첨가하였다. 세포를 96 웰 흑색 조직 배양 플레이트로 옮기고, 밀봉하였다. 플레이트를 회전시켰다. 평균 형광 강도 데이터를 수집하고, 셀로믹스 어레이스캔® VTi를 사용하여 분석하였다. 화합물 처리군을 비히클과 비교하여 퍼센트 억제 데이터를 결정하였다. 액티비티베이스 4.0으로 4 파라미터 로지스틱 곡선 피팅 분석을 사용하여 상대 IC<sub>50</sub>을 계산하였다.

[0094] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 0.035  $\mu$ M +/- 0.013  $\mu$ M (n=65)의 IC<sub>50</sub>으로 JAK2를 억제하였다. 이러한 결과는 실시예 1의 화합물이 JAK2 EPO-TF 1/pSTAT5 세포-기반 검정에서 JAK2의 강력한 억제제인 것을 나타낸다.

[0095] JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 세포-기반 검정 - 셀로믹스 어레이스캔® HCS

[0096] IL-2는 자연 킬러 (NK) 세포에서 JAK3 경로를 활성화시켜 NK 및 CD8 램프구 증식을 유도한다. 따라서, IL-2 자극된 NK92 /pSTAT5 세포-기반 검정은 시험관내 JAK 화합물의 JAK3 세포 활성의 평가를 가능하게 하였다.

[0097] NK-92 (자연 킬러) 세포 (ATCC, 버지니아주 마나사스)를 15% 태아 소 혈청, 15% 말 혈청 및 1x 항생제/항진균제 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스베드)를 함유하는 최소 필수 배지 (MEM) 알파 중에서 유지하였다. 4 ng/mL의 최종 농도를 위해 배지를 IL-2 (R&D 시스템즈(R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스)로 보충하였다. 세포를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 하에 유지하였다. 세포를 무혈청 배지 중에서 기아를 겪게 하여 내인성 성장 인자를 제거하였다. NK-92 세포를 카운팅하고, 수집하여 웨일 2x10<sup>5</sup> 개의 세포 밀도로 96-웰 플레이트당 2x10<sup>7</sup> 개의 세포를 시딩하였다. 비보충형 MEM 알파(MEM Alpha) (MEM 알파)를 사용하여 세포를 2회 세정한 후, 0.6% 혈청 (0.3% FBS, 0.3% 말 혈청)을 함유하는 MEM 알파 중에서 8x10<sup>5</sup> 개 세포/mL의 최종 농도로 세포를 혼탁시켰다. 혼탁한 세포를 다시 조직 배양 플라스크에 첨가하고, 밤새 37°C에서 인큐베이션하였다. 시험 화합물을 100% DMSO 중에서 10 mM의 농도로 제조하였다. 화합물을 10 포인트-200 x 농도-반응 범위 (4 mM- 200 nM)로 100% DMSO를 사용하여 연속적으로 1:3 희석하였다. 개별 96 딥 웰 플레이트에서, 4x 농도 화합물 플레이트를 위해 125  $\mu$ L의 10% FBS 완전 RPMI 1640 배지에 2.5  $\mu$ L의 200x 화합물 용액을 첨가하였다. 검정을 수행하기 위해, 혈청-기아 세포를 수집하고, 비보충형 RPMI 1640 배지를 사용하여 1회 세척하였다. 8x10<sup>5</sup> 개 세포/mL의 최종 농도를 위해 10% FBS 완전 RPMI 1640 배지 중에 세포를 혼탁시켰다. 혼탁한 세포 ( $2 \times 10^5$  개의 세포) 250  $\mu$ L의 분취액을 4x 농도 화합물 플레이트 중 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 볼테싱시킴으로써 혼합하고, 플레이트를 37°C 수조에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 사전에 가온시킨 10% FBS 완전 RPMI 배지를 사용하여 2 ng/mL의 신선한 4x IL-2 작업 용액을 제조하였다. 세포를 10분 동안 화합물로 처리한 후, 125  $\mu$ L의 IL-2 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 볼테싱시킴으로써 혼합하였다. 세포를 37°C 수조에서 20분 동안 인큐베이션하고, 인큐베이션 시간 동안 매 5분마다 혼합하였다. 마지막 10 포인트 농도-반응 범위는 0.5%의 DMSO 및 0.5 ng/mL의 IL-2의 최종 농도에서 20  $\mu$ M-1 nM이었다. 세포를 처리한 후, (포스페이트-완충 염수 (PBS)로 새로 제조되고 37°C에서 가온 상태로 유지된) 500  $\mu$ L의 1% 포름알데히드 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 8-10회 도립시켜 혼합하였다. 플레이트를 37°C 수조에 10분 동안 두었다. 인큐베이션한 후, 세포 플레이트를 1200 rpm으로 5분 동안 실온에서 회전시켰다. 100  $\mu$ L의 세포 ( $2 \times 10^5$  개의 세포)를 남겨둔 채로 상청액을 흡인

시켰다. 세포를 볼텍싱시키고, 회전 단계를 반복하고, 최종 세척 후  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 함유하는 100  $\mu\text{L}$ 를 남겨두면서, 800  $\mu\text{L}$ 의 PBS를 사용하여 2회 세척하였다. 차가운 90% 메탄을 800  $\mu\text{L}$ 의 분취액을 세포에 첨가하고, -20°C에서 밤새 두었다. 플레이트를 회전시키고, 메탄을 제거하였다. 세포를 FACS 완충제 (5% FBS 및 0.02% 아지드화나트륨을 함유하는 PBS)를 사용하여 세척하였다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 완충제 중 마우스 항-pSTAT5 (pY694) 알렉사 플루오르 647®의 1:10 희석액 200  $\mu\text{L}$ 의 분취액을 세포에 첨가하였다. 세포를 잘 혼합하고, 실온에서 2시간 동안 어둠에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 100  $\mu\text{L}$ 의 세포를 남겨두었다. 2  $\mu\text{g/mL}$  퀘스트 (아크로스 오르가닉스, 뉴저지주 모리스 플레인스)의 작업 용액을 PBS를 사용하여 제조하였다. 분취액 200  $\mu\text{L}$ 를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 실온에서 10분 동안 어둠에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 50  $\mu\text{L}$ 의 시토픽스® (BD 바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세)를 세포에 첨가하였다. 세포를 96 웰 흑색 조직 배양 플레이트로 옮기고, 밀봉하였다. 플레이트를 회전시켰다. 평균 형광 강도 데이터를 수집하고, 셀로믹스 어레이스캔® VTi를 사용하여 분석하였다. 화합물 처리군을 비히클과 비교하여 퍼센트 억제 데이터를 결정하였다. 액티비티베이스 4.0으로 4 파라미터 로지스틱 곡선 피팅 분석을 사용하여 상대  $\text{IC}_{50}$ 을 계산하였다.

[0098] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 0.228  $\mu\text{M}$  +/- 0.076  $\mu\text{M}$  (n=61)의  $\text{IC}_{50}$ 으로 JAK3을 억제하였다. 상기 2개의 세포-기반 검정의 결과로부터, JAK3/JAK2의  $\text{IC}_{50}$  비는 6배 초과인 것으로 결정하였으며, 이는 실시예 1의 화합물이 JAK2 EPO-TF 1/pSTAT5 및 JAK3 IL-2-NK-92/pSTAT5 세포-기반 검정에서 JAK3에 비해 JAK2에 대해 선택적인 것을 증명하였다.

[0099] DS1-알파스크린-pSTAT3-세포-기반 검정

[0100] DS1-알파스크린-pSTAT3-세포-기반 검정을 사용하여 IL6-자극된 STAT3 경로를 차단하는데 대한 화합물의 효력을 조사하였다. JAK-STAT3 경로는 많은 유형의 암에서 구성적으로 활성이고, 종양 세포에서 증식, 생존 및 침습을 증가시키는데 관련된다. DS1 세포 (ATCC)를 10% FBS를 함유하는 RPMI 완전 배지 중에서 배양한 다음, 채택하고, 37°C에서 95% 습도에서 및 5%  $\text{CO}_2$ 의 분위기 하에 10% FBS로 보충된 DMEM/고도 개질된 배지 중에서 성장시켰다. DS1 세포를 96 웰-플레이트 내에서  $4 \times 10^4$ 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하고, 무혈청 배양 배지 중에서 37°C에서 3시간 동안 배양한 후, 비히클 단독 (DMSO) 또는 0-20  $\mu\text{M}$ 의 최종 농도 범위의 시험 화합물로 10분 동안 전처리하였다. 이어서, IL6 (R&D 시스템즈, 206-IL)을 세포 배양물에 10 ng/ml 최종 농도로 첨가하였으며, 이를 추가 30분 동안 37°C에서 유지하였다. 최종적으로, 세포를 5X 알파 용해 완충제로 용해시키고, pSTAT3 검출 (#TGRS3SHV100)을 위해 반응 혼합물 (TGR 바이오사이언시스 (TGR Biosciences), 호주 사우스 오스트레일리아, #TGRS3S10K)로 충전된 384-웰 플레이트 (퍼킨엘머, #6008280)로 옮겼다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하고, pSTAT3을 엔비전06 플레이트 판독기 (TGR 바이오사이언시스, 호주 사우스오스트레일리아)를 사용함으로써 측정하였다. 데이터를 액티비티베이스 4.0으로 분석하였다.

[0101] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 0.066 +/- 0.023  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 으로 IL-6-STAT3 신호전달을 억제하였다. 이러한 결과는 실시예 1의 화합물이 DS1-알파스크린-pSTAT3-세포-기반 검정에서 IL-6 자극된 JAK-STAT3 경로를 억제하는 것을 증명하였다.

[0102] Mia-Paca2-MSD-pSTAT3 세포-기반 검정

[0103] Mia-Paca2-MSD (메조스케일 다이아그노스틱스 (MesoScale Diagnostics))-pSTAT3 세포-기반 검정을 사용하여 췌장암 세포에서 STAT3 인산화를 차단하는데 대한 화합물의 효력을 조사하였다. Mia-paca2 세포 (ATCC)를 10% FBS로 보충된 DMEM 완전 배지 중에서 37°C에서 5%  $\text{CO}_2$  하의 인큐베이터 내에서 성장시켰다. 이어서, 세포를 수집하고, 카운팅하고, 96-웰 플레이트에서  $4 \times 10^4$ 개 세포/웰로 플레이팅하고, 밤새 37°C에서 5%  $\text{CO}_2$  하에 배양하였다. 배양 배지를 세포로부터 제거하고, 비히클 단독 (DMSO) 또는 1:3 희석 (10회 희석)에서의 0-20  $\mu\text{M}$  범위의 2X 최종 농도의 화합물을 함유하는 무혈청 배지로 대체하였다. 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후에, 10일 MIA PACA2 배양 상청액 (조건화 배지) 100 마이크로리터를 플레이트에 첨가하여 STAT3을 활성화시켰다. 세포를 5%  $\text{CO}_2$ 로 보충된 인큐베이터 내에서 추가 20분 동안 37°C에서 처리하였다. 자극 후에, 모든 배지를 상기와 같이 수동으로 제거하고, 세포를 1X HALT 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일 (씨모 사이언티픽 (Thermo Scientific), 78441)을 함유하는 빙냉 1X MSD 용해 완충제 (메조스케일 다이아그노스틱스, K150DID-2) 50 마이크로리터 중에 용해시켰다. 96-웰 플레이트를 밀봉한 다음, 2분 동안 오비탈 진탕기 상에서 실온에서

혼합하고, 이어서 즉시 -80°C에서 밤새 냉동시켰다. 하기와 같이 포스포-STAT3 (Tyr 705) (메조스케일 다이아그노스틱스, # K150DID-2)을 위한 MA6000 MSD 전세포 용해물 키트를 사용하여 pSTAT3을 검출하고, 플레이트를 진탕하면서 실온에서 1-2시간 동안 차단 완충제로 차단한 다음, 세척 완충제로 4X 세척하였다. 단백질 용해물 25  $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 추가 1-2시간 동안 배양하였다. 세척 완충제로 플레이트를 4X 세척한 후 플레이트를 MSD 플레이트 판독기 6000으로 판독하고, 데이터를 그래프 패드 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0104] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 12 nM의 IC<sub>50</sub>으로 STAT3의 인산화를 억제하였다. 이러한 결과는 실시예 1의 화합물이 췌장암 세포주에서 JAK-STAT3 경로를 억제하는 것을 증명하였다.

[0105] SUM-159-MSD-pSTAT3 세포-기반 검정

[0106] SUM-159-MSD-pSTAT3 세포-기반 검정을 사용하여 유방암 세포에서 STAT3 인산화를 차단하는데 대한 화합물의 효력을 조사하였다. Sum-159 세포 (에스터랜드(Asterand))를 5% FBS, 인슐린 (5 마이크로그램/mL) 및 히드로코르티손 (1  $\mu$ g/mL)을 함유하는 햄 F-12 배지 (깁코(Gibco) 11765-054) 중에서 성장시키고 유지하였다. 세포를 수집하고, 카운팅하고, 96-웰 플레이트에서 4x10<sup>4</sup>개 세포/웰로 플레이팅하고, 밤새 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 하에 배양하였다. 이어서, 배양 배지를 제거하고, 비히클 (DMSO) 단독 또는 1:3 희석 (10 농도 포인트)에서의 0-20  $\mu$ M 범위의 2X 최종 농도의 화합물을 함유하는 F-12-배지로 대체하였다. 추가 5시간 동안 인큐베이션한 후에, 배지를 제거하고, 세포를 2X 인간 IL-6 (F-12 완전 배지 중에 희석된 20 ng/mL) 100 마이크로리터로 처리하고, 추가 20 분 동안 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 하에 인큐베이션하였다. 자극 후에, 모든 배지를 상기와 같이 수동으로 제거하고, 세포를 1X HALT 프로테아제 및 포스파타제 억제제 칵테일을 함유하는 빙냉 1X MSD 용해 완충제 50 마이크로리터 중에 용해시켰다. 96-웰 플레이트를 밀봉한 다음, 2분 동안 오비탈 진탕기 상에서 실온에서 혼합한 다음, 즉시 -80°C에서 밤새 냉동시켰다. 상기 기재된 바와 같이 포스포-STAT3 (Tyr 705) (메조스케일 다이아그노스틱스, # K150DID-2)을 위한 MA6000 MSD 전세포 용해물 키트를 사용하여 pSTAT3을 검출하였다. 플레이트를 MSD 플레이트 판독기를 사용함으로써 판독하였다. 데이터를 그래프 패드 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0107] 본 발명의 범위 내의 화합물을 실질적으로 상기와 같은 본 검정에서 시험하였다. 실시예 1의 화합물은 21 nM의 IC<sub>50</sub>으로 STAT3의 인산화를 억제하였다. 이러한 결과는 실시예 1의 화합물이 유방암 세포주에서 JAK-STAT3 경로를 억제하는 것으로 제시하였다.