



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월22일
(11) 등록번호 10-2732167
(24) 등록일자 2024년11월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/06 (2006.01) A61K 31/4545 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C07D 213/61 (2006.01)
C07D 213/803 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 401/06 (2013.01)
A61K 31/4545 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7024908
- (22) 출원일자(국제) 2019년01월29일
심사청구일자 2022년01월28일
- (85) 번역문제출일자 2020년08월28일
- (65) 공개번호 10-2020-0129099
- (43) 공개일자 2020년11월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/015582
- (87) 국제공개번호 WO 2019/152374
국제공개일자 2019년08월08일
- (30) 우선권주장
62/623,664 2018년01월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2012102140 A*
JP2013522214 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
인사이트 코포레이션
미국 델라웨어주 19803 윌밍톤 어거스틴 컷-오프 1801
- (72) 발명자
왕 덩진
미국 델라웨어주 19803 윌밍톤 어거스틴 컷-오프 1801 인사이트 코포레이션
류 평리
미국 델라웨어주 19803 윌밍톤 어거스틴 컷-오프 1801 인사이트 코포레이션
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 43 항

심사관 : 최경윤

(54) 발명의 명칭 (1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티닐)피페리딘-4-온)의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 염증성 장애, 자가면역 장애, 암, 및 다른 질환을 포함한 야누스 키나제 (JAK)의 활성화에 관련된 질환의 치료에 유용한, {1-[1-[3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일]피페리딘-4-일]-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세트니트릴을 제조하는 방법 및 중간체에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 중간체인 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일 클로라이드 및 4-하이드록시 피페리딘 또는 4-피페리돈으로부터 (1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티닐)피페리딘-4-온) 및 중간체인 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일 클로라이드의 제조방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

C07D 213/61 (2013.01)

C07D 213/803 (2013.01)

C07D 487/04 (2022.08)

(72) 발명자

우 용중

미국 델라웨어주 19803 윌밍톤 어거스틴 컷-오프
1801 인사이트 코포레이션

저우 자청

미국 델라웨어주 19803 윌밍톤 어거스틴 컷-오프
1801 인사이트 코포레이션

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 III의 화합물:



III

또는 이의 염을, 4-하이드록시피페리딘과 반응시켜 하기 화학식 IV의 화합물:



IV

또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 4-하이드록시피페리딘과의 반응은 염기의 존재에서 수행되는, 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 염기는 삼차 아민인, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 삼차 아민은 *N,N*-디이소프로필에틸아민인, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 4-하이드록시피페리딘과의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행되는, 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 4-하이드록시피페리딘과의 반응은 25°C 내지 35°C의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 III의 화합물은 하기 화학식 II의 화합물:



II

또는 이의 염을 옥살릴 클로라이드와 반응시켜 화학식 III의 화합물, 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성되는, 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 촉매량의 디메틸 포름아미드(DMF)의 존재에서 수행되는, 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행되는, 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 15°C 내지 25°C의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 IV의 화합물, 또는 이의 염을 산화 조건 하에서 반응시켜 하기 화학식 V의 화합물:



V

또는 이의 염을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 산화 조건은 제1 산화제를 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 산화 조건은 제2 산화제를 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 제1 산화제는 트리클로로이소시아누르산 (TCIC)인, 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 TCIC는 화학식 IV의 화합물에 대해 0.5 내지 0.7 몰 당량 사이로 존재하는, 방법.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 제2 산화 제제는 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO)인, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 TEMPO는 화학식 IV의 화합물에 대해 0.015 내지 0.025 몰 당량 사이로 존재하는, 방법.

청구항 18

청구항 11에 있어서, 산화 조건 하에서 화학식 IV의 화합물의 반응은 중탄산나트륨, 탄산나트륨, 및 나트륨 브로마이드 중 하나 이상을 더 포함하는, 방법.

청구항 19

청구항 11에 있어서, 산화 조건 하에서 화학식 IV의 화합물의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분을 더 포함하는, 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 용매 성분은 물을 더 포함하는, 방법.

청구항 21

청구항 11에 있어서, 상기 산화 조건은 0°C 내지 5°C의 온도에서 화학식 IV의 화합물 및 TEMPO를 포함하는 용액에 트리클로로이소시아누르산의 첨가를 포함하는, 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 트리클로로이소시아누르산의 첨가는 적어도 2 분획으로 트리클로로이소시아누르산을 첨가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

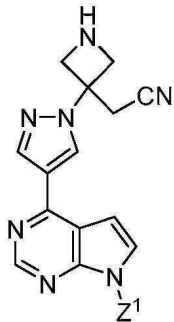
청구항 21에 있어서, 상기 용액은 30분 동안 0°C 내지 5°C의 온도에서 상기 첨가 후에 교반되는, 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 교반 후 상기 용액을 1시간 내지 2시간의 시간 동안 20°C 내지 25°C의 온도로 가온하는 단계를 더 포함하는, 방법.

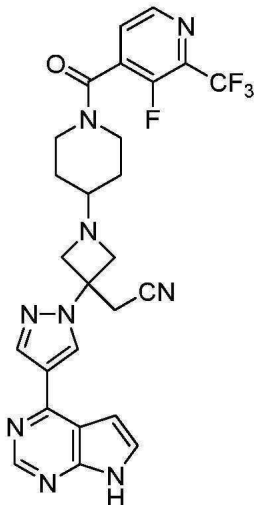
청구항 25

청구항 11에 있어서, 환원제의 존재에서 상기 화학식 V의 화합물을 하기 화학식 VI의 화합물:



VI

또는 이의 염과 반응시켜, 하기 화학식 I의 화합물:



I

또는 이의 염을 형성하는 단계를 더 포함하며;

상기에서 Z¹은 H 또는 보호기인, 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, Z¹은 H인, 방법.

청구항 27

청구항 25에 있어서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 또는 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드인, 방법.

청구항 28

하기 화학식 III의 화합물:



III

또는 이의 염을 4-피페리돈 또는 이의 염과 반응시켜 하기 화학식 V의 화합물:



V

또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 4-피페리돈, 또는 이의 염은 4-피페리돈 하이드로클로라이드인, 방법.

청구항 30

청구항 28에 있어서, 상기 4-피페리돈, 또는 이의 염은 4-피페리돈 하이드로클로라이드 일수화물인, 방법.

청구항 31

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 반응은 염기를 더 포함하는, 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 염기는 탄산나트륨인, 방법.

청구항 33

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 III의 화합물과 4-피페리돈과의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행되는, 방법.

청구항 34

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 III의 화합물과 4-피페리돈과의 반응은 0℃ 내지 5℃의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 35

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 III의 화합물은 하기 화학식 II의 화합물:



II

또는 이의 염을 옥살릴 클로라이드와 반응시켜 화학식 III의 화합물, 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성되는, 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 촉매량의 디메틸 포름아미드(DMF)의 존재에서 수행되는, 방법.

청구항 37

청구항 35에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행되는, 방법.

청구항 38

청구항 35에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응은 15℃ 내지 25℃의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 39

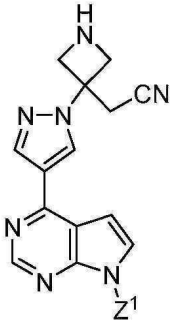
청구항 35에 있어서, 상기 화학식 III의 화합물은 상기 화학식 III의 화합물이 4-피페리돈과 반응하기 전에는 단리되지 않는, 방법.

청구항 40

청구항 35에 있어서, 상기 화학식 II의 화합물과 옥살릴 클로라이드와의 반응 및 상기 화학식 III의 화합물과 4-피페리돈과의 반응은 단일 반응기에서 수행되는, 방법.

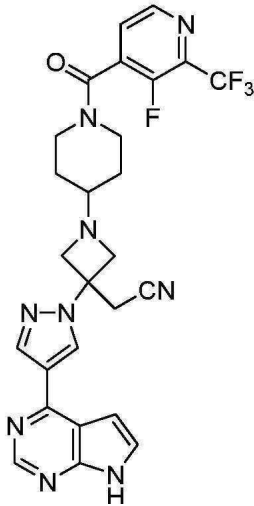
청구항 41

청구항 28 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 환원제의 존재에서 상기 화학식 V의 화합물을 하기 화학식 VI의 화합물:



VI

또는 이의 염과 반응시켜, 하기 화학식 I의 화합물:



I

또는 이의 염을 형성하는 단계를 더 포함하며;

상기에서 Z¹은 H 또는 보호기인, 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, Z¹은 H인, 방법.

청구항 43

청구항 41에 있어서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드 또는 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드인, 방법.

청구항 44

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 염증성 장애, 자가면역 장애, 암, 및 다른 질환을 포함한 야누스 키나제 (JAK)의 활성화에 관련된 질환

[0001]

의 치료에 유용한, {1-{1-[3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7H-피롤로 [2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세트니트릴을 제조하기 위한 방법 및 중간체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 단백질 키나제 (PK)는 그 중에서도 세포 성장, 생존, 분화, 장기 형성, 형태발생, 신생혈관형성, 조직 치유, 및 재생을 비롯한 다양한 생물학적 과정을 조절한다. 단백질 키나제는 또한 암을 포함한 인간 질환의 숙주에서 특화된 역할을 수행한다. 저-분자량 폴리펩타이드 또는 당단백질인 사이토카인은 패혈증에 대한 숙주 염증성 반응에 관련된 많은 경로를 조절한다. 사이토카인은 세포 분화, 증식 및 활성화에 영향을 미치고, 숙주가 병원체에 적절하게 반응할 수 있도록 전-염증 및 항-염증 반응 둘 모두를 조절할 수 있다. 광범위한 사이토카인의 신호전달은 단백질 티로신 키나제의 야누스 키나제 계열 (JAK) 및 전사의 신호 변환체 및 활성화제 (STAT)를 포함한다. 4종의 공지된 포유동물의 JAK가 있다: JAK1 (야누스 키나제-1), JAK2, JAK3 (야누스 키나제, 백혈구; JAKL; 및 L-JAK로도 알려져 있음), 및 TYK2 (단백질-티로신 키나제 2).
- [0003] 사이토카인-자극된 면역 및 염증 반응은 질환의 발병에 기여한다: 병리학 예컨대 중증 복합성 면역결핍 (SCID)은 면역계의 억제로부터 발생하는 반면, 과반응 또는 부적절한 면역/염증 반응은 자가면역 질환 (예를 들어, 천식, 전신 홍반성 낭창, 갑상선염, 심근염)과 병 예컨대 경피증 및 골관절염의 병리학에 기여한다 (Ortmann, R. A., T. Cheng, *et al.* (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32).
- [0004] JAK의 발현에서의 결핍은 많은 질환 상태와 관련된다. 예를 들어, Jak1^{-/-} 마우스는 태생시에 왜소하고, 병구완되지 못하고, 출산전후에 사망한다 (Rodig, S. J., M. A. Meraz, *et al.* (1998) *Cell* 93(3): 373-83). Jak2^{-/-} 마우스 배아는 빈혈이 있고 최종적인 적혈구생성의 부재에 기인하여 교배후 12.5일차 부근에서 사망한다.
- [0005] JAK/STAT 경로, 및 특히 모든 4종의 JAK는 천식성의 반응, 만성적 폐쇄성 폐 질환, 기관지염, 및 허부 기도의 다른 관련된 염증성 질환의 발병에서 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. JAK를 통해 신호를 보내는 다중 사이토카인은 고전적으로 알려지성 반응이든 아니든 간에 코 및 부비강에 영향을 미치는 것 (예를 들어, 비염 및 부비강염)과 같이 상부 기도의 염증성 질환/병태에 연결되어 있다. JAK/STAT 경로는 또한 눈 및 만성 알려지성 반응의 염증성 질환/병태에 연루되어 있다.
- [0006] 암에서 JAK/STAT의 활성화는 사이토카인 자극 (예를 들어 IL-6 또는 GM-CSF)의하거나 또는 JAK 신호전달 예컨대 SOCS (억제제 또는 사이토카인 신호전달) 또는 PIAS (활성화된 STAT의 단백질 억제제)의 내인성 억제제에서의 감소에 의해 발생할 수 있다 (Boudny, V., and Kovarik, J., *Neoplasms*. 49:349-355, 2002). STAT 신호전달, 뿐만 아니라 JAK의 다른 경로 다운스트림 (예를 들어, Akt)의 활성화는 많은 암 유형에서 불량한 예후와 상관되어 있다 (Bowman, T., *et al.* *Oncogene* 19:2474-2488, 2000). JAK/STAT를 통해 신호를 보내는 순환하는 사이토카인의 상승된 수준은 악액질 및/또는 만성 피로에서 원인적 역할을 수행한다. 이와 같이, JAK 억제제는 잠재적인 항종양 활성을 넘어 확장하는 이유 때문에 암 환자에게 유익할 수 있다.
- [0007] JAK2 티로신 키나제는 골수증식성 장애, 예를 들어, 진성 적혈구증가증 (PV), 본태성 혈소판증가증 (ET), 골수 섬유증이 있는 골수성 화생 (MMM)이 있는 환자에 대해 유익할 수 있다 (Levin, *et al.*, *Cancer Cell*, vol. 7, 2005: 387-397). JAK2V617F 키나제의 억제는 조혈 세포의 증식을 감소시켜서, PV, ET 및 MMM이 있는 환자에서 약리적 억제에 대한 잠재적 표적으로서 JAK2를 시사한다.
- [0008] JAK의 억제는 피부 면역 장애 예컨대 건선, 및 피부 민감화를 앓고 있는 환자에게 유리할 수 있다. 건선의 유지는 다양한 케모카인 및 성장 인자 (JCI, 113:1664-1675)에 더하여 다수의 염증성 사이토카인에 의존하는 것으로 여겨지며, 이들 중 다수는 JAK를 통해 신호를 보낸다 (*Adv Pharmacol.* 2000;47:113-74).
- [0009] JAK1은 이상조절될 때 질환 상태를 초래하거나 그에 기여할 수 있는 다수의 사이토카인 및 성장 인자 신호전달 경로에서 중추적 역할을 한다. 예를 들어, IL-6 수준은 류마티스성 관절염에서 상승되는데, 이는 해로운 영향을 미치는 것으로 제안된 질환이다 (Fonesca, J.E. *et al.*, *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). IL-6은 적어도 부분적으로 JAK1을 통해 신호를 보내기 때문에, JAK1 억제를 통해 직접적으로 또는 간접적으로 IL-6을 길항하는 것은 임상 이득을 제공할 것으로 예상된다 (Guschin, D., N., *et al* *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, J. S., *et al.* *Lancet* 371:987, 2008). 또한, 일부 암에서 JAK1은 돌연변이되어 구성적 바람직하지 않은 종양 세포 성장 및 생존을 초래한다 (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci U S A.*106:9414-8, 2009; Flex E., *et al.* *J Exp Med.* 205:751-8, 2008). 다른 자가면역 질환 및 암에서, JAK1을 활성화시키는 염증성 사이토카인의 상승된 전신 수준은 또한 질환 및/또는 관련된 증상에 기여할 수 있다. 따라서, 그러한 질환이 있는 환자는 JAK1 억제

[0018] III

[0019] 또는 이의 염을, 4-하이드록시피페리딘과 반응시켜 하기 화학식 IV의 화합물:



[0020]

[0021] IV

[0022] 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 명세서에 기재된 방법은 화학식 IV의 화합물, 또는 이의 염을 산화 조건 하에서 반응시키는 단계를 추가로 포함하여 하기 화학식 V의 화합물:



[0024]

[0025] V

[0026] 또는 이의 염을 형성할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한 하기 화학식 III의 화합물:



[0028]

[0029] III

[0030] 또는 이의 염을 4-피페리돈 또는 이의 염과 반응시켜 하기 화학식 V의 화합물:



[0031]

[0032] V

[0033] 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

층 크로마토그래피 (TLC) 또는 다른 관련된 기술에 의해 모니터링될 수 있다.

- [0048] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "반응"은 당해 분야에서 알려진 바와 같이 사용되고, 일반적으로 분자 수준에서의 그것의 상호작용이 화학적 또는 물리적 변형을 달성하도록 하는 방식으로 화학 시약을 접촉시키는 것을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 반응은 2종의 시약을 포함하며, 여기서 하나 이상의 등가의 제2 시약이 제1 시약에 대하여 사용된다. 본 명세서에 기재된 방법의 반응 단계들은 확인된 생성물을 제조하기에 적합한 시간 및 조건하에 수행될 수 있다.
- [0049] 화합물의 제조는 다양한 화학기의 보호 및 탈보호를 포함할 수 있다. 보호 및 탈보호의 필요성, 및 적절한 보호기의 선택은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 보호기의 화학은, 예를 들어, Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007에서 찾아볼 수 있고, 이것은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 본 명세서에서 기재된 보호기에 대한 조정과 형성 및 절단 방법은 다양한 치환체에 비추어 필요에 따라 조정될 수 있다.
- [0050] 본 명세서에 기재된 방법의 반응은 유기 합성의 기술 분야에서 숙련가에 의해 쉽게 선택될 수 있는 적합한 용매에서 수행될 수 있다. 적합한 용매는 반응이 수행되는 온도, 예를 들어, 용매의 냉동 온도 내지 용매의 비등 온도의 범위일 수 있는 온도에서 개시 물질 (반응물), 중간체, 또는 생성물과 실질적으로 비반응성일 수 있다. 주어진 반응은 1종의 용매 또는 1종 초과 용매의 혼합물에서 수행될 수 있다. 특정한 반응 단계에 의존하여, 특정 반응 단계에 적합한 용매가 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응은 시약 중 적어도 하나가 액체 또는 가스인 경우와 같이, 용매의 부재에서 수행될 수 있다.
- [0051] 적합한 용매는 할로젠화된 용매 예컨대 탄소 테트라클로라이드, 브로모디클로로메탄, 디브로모클로로메탄, 브로모포름, 클로로포름, 브로모클로로메탄, 디브로모메탄, 부틸 클로라이드, 디클로로메탄, 테트라클로로에틸렌, 트리클로로에틸렌, 1,1,1-트리클로로에탄, 1,1,2-트리클로로에탄, 1,1-디클로로에탄, 2-클로로프로판, a, a, a-트리플루오로톨루엔, 1,2-디클로로에탄, 1,2-디브로모에탄, 헥사플루오로벤젠, 1,2,4-트리클로로벤젠, 1,2-디클로로벤젠, 클로로벤젠, 플루오로벤젠, 이들의 혼합물 및 기타 동종의 것을 포함할 수 있다.
- [0052] 적합한 에테르 용매는 하기를 포함한다: 디메톡시메탄, 테트라하이드로푸란, 1,3-디옥산, 1,4-디옥산, 푸란, 디에틸 에테르, 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 에틸렌 글리콜 디에틸 에테르, 디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 디에틸렌 글리콜 디에틸 에테르, 트리에틸렌 글리콜 디메틸 에테르, 아니솔, t-부틸 메틸 에테르, 이들의 혼합물 및 기타 동종의 것.
- [0053] 적합한 양성자성 용매는, 예로써 그리고 비제한적으로, 물, 메탄올, 에탄올, 2-니트로에탄올, 2-플루오로에탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올, 에틸렌 글리콜, 1-프로판올, 2-프로판올, 2-메톡시에탄올, 1-부탄올, 2-부탄올, i-부틸 알코올, t-부틸 알코올, 2-에톡시에탄올, 디에틸렌 글리콜, 1-, 2-, 또는 3- 펜탄올, 네오-펜틸 알코올, t-펜틸 알코올, 디에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르, 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르, 사이클로헥산올, 벤질 알코올, 페놀, 또는 글리세롤을 포함할 수 있다.
- [0054] 적합한 비양성자성 용매는, 예로써 그리고 비제한적으로, 테트라하이드로푸란 (THF), N,N-디메틸포름아미드 (DMF), N,N-디메틸아세트아미드 (DMA), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2(1H)-피리미딘 (DMPU), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘 (DMI), N-메틸피롤리딘 (NMP), 포름아미드, N-메틸아세트아미드, N-메틸포름아미드, 아세토니트릴, 디메틸 설펍사이드, 프로피오니트릴, 에틸 포르메이트, 메틸 아세테이트, 헥사클로로아세톤, 아세톤, 에틸 메틸 케톤, 에틸 아세테이트, 설펍란, N,N-디메틸프로피온아미드, 테트라메틸우레아, 니트로메탄, 니트로벤젠, 또는 헥사메틸포스포르아미드를 포함할 수 있다.
- [0055] 적합한 탄화수소 용매는 벤젠, 사이클로헥산, 펜탄, 헥산, 톨루엔, 사이클로헥탄, 메틸사이클로헥산, 헵탄, 에틸벤젠, m-, o-, 또는 p-자일렌, 옥탄, 인단, 노난, 또는 나프탈렌을 포함한다.
- [0056] 본 명세서에 기재된 방법의 반응은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있는 적절한 온도에서 수행될 수 있다. 반응 온도는, 예를 들어, 존재할 경우, 시약 및 용매의 융점 및 비점; 반응의 열역학 (예를 들어, 격렬하게 발열하는 반응은 감소된 온도에서 수행되는 것이 필요할 수 있다); 및 반응의 동력학 (예를 들어, 높은 활성화 에너지 장벽은 승온을 필요로 할 수 있다)에 의존할 것이다. "승온(elevated temperature)"은 실온 (약 22°C) 이상의 온도를 지칭한다.
- [0057] 본 명세서에 기재된 방법의 반응은 공기 중에서 또는 불활성 분위기하에서 수행될 수 있다. 전형적으로, 공기와 실질적으로 반응성인 시약 또는 생성물을 함유하는 반응은 당업자에게 잘 알려진 공기-민감성 합성 기술을 사용

하여 수행될 수 있다.

[0058] 일부 실시형태에서, 화합물의 제조는, 예를 들어, 원하는 반응의 촉매작용 또는 염 형태 예컨대 산 부가 염의 형성을 효과적으로 하기 위해 산 또는 염기의 첨가를 포함할 수 있다.

[0059] 예시적인 산은 무기 또는 유기 산일 수 있다. 무기 산은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 및 질산을 포함한다. 유기 산은 포름산, 아세트산, 프로피온산, 부탄산, 벤조산, 4-니트로벤조산, 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 벤젠설폰산, 타르타르산, 트리플루오로아세트산, 프로피올산, 부티르산, 2-부틴산, 비닐 아세트산, 펜탄산, 헥산산, 헵탄산, 옥탄산, 노난산 및 데칸산을 포함한다.

[0060] 예시적인 염기는 수산화리튬, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 리튬 카보네이트, 탄산나트륨, 탄산칼륨, 및 중탄산나트륨을 포함한다. 일부 예시적인 강염기는 비제한적으로, 하이드록사이드, 알콕사이드, 금속 아마이드, 금속 하이드라이드, 금속 디알킬아미드 및 아릴아민을 포함하며, 여기서; 알콕사이드는 메틸, 에틸 및 t-부틸 옥사이드의 리튬, 나트륨 및 칼륨 염을 포함하고; 금속 아마이드는 나트륨 아마이드, 칼륨 아마이드 및 리튬 아마이드를 포함하고; 금속 하이드라이드는 수소화나트륨, 칼륨 하이드라이드 및 리튬 하이드라이드를 포함하고; 그리고 금속 디알킬아미드는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, t-부틸, 트리메틸실릴 및 사이클로헥실 치환된 아마이드의 나트륨 및 칼륨 염을 포함한다.

[0061] 중간체 및 생성물은 또한 본 명세서에 개시된 화합물의 염을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "염"은 본 명세서에 개시된 화합물에 허용가능한 산 또는 염기의 첨가에 의해 형성된 염을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 염은 약제학적으로 허용가능한 염이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용가능한"은 독물학적 관점으로부터 약제학적 적용에 사용하는데 허용가능하고 활성 성분과 부정적으로 상호작용하지 않는 물질을 지칭한다. 모노- 및 바이- 염을 포함하여, 약제학적으로 허용가능한 염은, 비제한적으로, 유기 및 무기 산 예컨대, 비제한적으로, 아세트산, 락트산, 시트르산, 신남산, 타르타르산, 석신산, 푸마르산, 말레산, 말론산, 만델산, 말산, 옥살산, 프로피온산, 염산, 브롬화수소산, 인산, 질산, 황산, 글라이콜산, 피루브산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 톨루엔설폰산, 살리실산, 벤조산, 및 유사하게 알려진 허용가능한 산으로부터 유래된 것을 포함한다. 적합한 염의 목록은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 and Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977)에서 발견되고, 이들 각각은 그것의 전체로 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0062] 본 명세서에 기재된 방법에 따라 화합물의 제조를 실행할 때, 농축, 여과, 추출, 고체상 추출, 재결정화, 크로마토그래피, 및 기타 동종의 것과 같은 일반적인 단리 및 정제 조작을 사용하여 원하는 생성물을 단리할 수 있다.

[0063] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 화합물 및 이의 염은 실질적으로 단리된다. "실질적으로 단리된"은 화합물이 형성되거나 검출된 환경으로부터 적어도 부분적으로 또는 실질적으로 분리된다는 것을 의미한다. 부분적 분리는, 예를 들어, 본 발명의 화합물이 풍부한 조성물을 포함할 수 있다. 실질적인 분리는 본 발명 화합물, 또는 이의 염을 중량으로 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 또는 적어도 약 99%를 함유하는 조성물을 포함할 수 있다. 화합물 및 그것의 염을 단리하는 방법은 당업계에서 일상적이다.

[0064] 몇몇 중간체를 제조하기 위한 방법은 2015년 3월 24일 발행된 미국 특허 번호 8,987,443; 2016년 11월 8일 발행된 미국 특허 번호 9,487,521; 2013년 4월 2일 발행된 미국 특허 번호 8,410,265, 및 2014년 7월 1일 발행된 미국 특허 번호 8,765,734에서 발견될 수 있으며, 이들 각각은 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된다.

[0065] 공정 및 중간체

[0066] 본 발명은, 특히, 화학식 I의 화합물을 제조하기 위한 방법 및 중간체를 제공한다. 따라서, 일 양태에서, 하기 화학식 III의 화합물:



[0067]

[0068] III

[0069] 또는 이의 염을, 4-하이드록시피페리딘과 반응시켜 하기 화학식 IV의 화합물:



[0070]

[0071] IV

[0072] 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0073] 일부 실시형태에서, 4-하이드록시피페리딘과 반응은 염기의 존재에서 수행된다.

[0074] 일부 실시형태에서, 상기 염기는 삼차 아민이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 상기 삼차 아민은 *N,N*-디이소프로필에틸아민이다.

[0076] 일부 실시형태에서, 4-하이드록시피페리딘과 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행된다.

[0077] 일부 실시형태에서, 4-하이드록시피페리딘과 반응은 약 25°C 내지 약 35°C의 온도에서 수행된다.

[0078] 일부 실시형태에서, 화학식 III의 화합물은 하기 화학식 II의 화합물:



[0079]

[0080] II

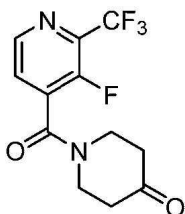
[0081] 또는 이의 염을 옥살릴 클로라이드와 반응시켜 화학식 III의 화합물, 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성된다.

[0082] 일부 실시형태에서, 옥살릴 클로라이드와 화학식 II의 화합물의 반응은 촉매량의 디메틸 포름아미드 (DMF)의 존재에서 수행된다. 일부 실시형태에서, DMF는 화학식 II의 화합물에 대해 약 0.01 내지 약 0.03 몰 당량으로 존재한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 옥살릴 클로라이드와 화학식 II의 화합물의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행된다.

[0084] 일부 실시형태에서, 옥살릴 클로라이드와 화학식 II의 화합물의 반응은 약 15°C 내지 약 25°C의 온도에서 수행된다.

[0085] 본 명세서에 기재된 방법은 추가로 화학식 IV의 화합물, 또는 이의 염을 산화 조건하에서 반응시켜 하기 화학식 V의 화합물:



[0086]

[0087] V

[0088] 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0089] 일부 실시형태에서, 산화 조건은 적어도 하나의 산화제 (즉, 제1 산화제)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 산화 조건은 제2 산화제를 포함한다.

[0090] 일부 실시형태에서, 산화제는 트리클로로이소시아누르산 (TCIC)이다. 일부 실시형태에서, TCIC는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.5 내지 약 0.7 몰 당량으로 존재한다.

[0091] 일부 실시형태에서, 산화제는 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘옥시 (TEMPO)이다. 일부 실시형태에서, TEMPO는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.005 내지 약 0.05 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, TEMPO는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.015 내지 약 0.025 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, TEMPO는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.020 몰 당량으로 존재한다.

[0092] 일부 실시형태에서, 산화 조건은 적어도 TCIC (제1 산화제) 및 TEMPO (제2 산화제)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 산화 조건은 금속 브로마이드, 예를 들어, 나트륨 브로마이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 나트륨 브로마이드는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.005 내지 약 0.015 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 나트륨 브로마이드는 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.01 당량으로 존재한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 산화 조건은 추가로 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 염기는 중탄산나트륨 및/또는 탄산나트륨이다. 일부 실시형태에서, 중탄산나트륨은 화학식 IV의 화합물에 대해 약 1 내지 약 10 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 중탄산나트륨은 화학식 IV의 화합물에 대해 약 5 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 탄산나트륨은 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.1 내지 약 1 몰 당량으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 탄산나트륨은 화학식 IV의 화합물에 대해 약 0.5 몰 당량으로 존재한다.

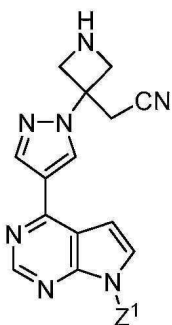
[0094] 일부 실시형태에서, 산화 조건하에서 화학식 IV의 화합물의 반응은 추가로 중탄산나트륨, 탄산나트륨, 및 나트륨 브로마이드 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 산화 조건하에서 화학식 IV의 화합물의 반응은 추가로 중탄산나트륨, 탄산나트륨, 및 나트륨 브로마이드를 포함한다.

[0095] 일부 실시형태에서, 산화 조건하에서 화학식 IV의 화합물의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 용매 성분은 물을 추가로 포함한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 산화 조건은 약 0°C 내지 약 5°C의 온도에서 화학식 IV의 화합물 및 TEMPO를 포함하는 용액에 트리클로로이소시아누르산 (TCIC)의 첨가를 포함한다. 일부 실시형태에서, 트리클로로이소시아누르산의 첨가는 적어도 2 분획으로 트리클로로이소시아누르산을 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액은 상기 첨가 후 약 0°C 내지 약 5°C의 온도에서 약 30분 동안 교반된다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 상기 교반 후, 상기 용액을 약 20°C 내지 약 25°C의 온도에서 약 1시간 내지 약 2시간의 시간 동안 데우는 단계를 추가로 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 본 산화 조건은 약 99% 초과 순도를 갖는 화학식 V의 화합물을 초래한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 환원제의 존재에서 화학식 V의 화합물을 하기 화학식 VI의 화합물:



[0099]

[0100] VI

1-일)아제티딘-3-일)아세토니티릴 이염산염이다. 일부 실시형태에서, 반응은 적어도 2 당량의 제2 염기의 존재에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 제2 염기는 삼차 아민 (예를 들어, 트리에틸아민)이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "제2 염기"에서 "제2"는 본 염기를 방법의 이전 또는 이후 단계들에서 사용된 다른 염기와 차별화하기 위해서 사용되고 두 염기가 반드시 존재해야 한다는 것을 나타내지는 않는다.

[0110] 일부 실시형태에서, 화학식 VI의 화합물, 또는 이의 염에 기반하여 1 초과 당량의 화학식 V의 화합물이 사용된다.

[0111] 일부 실시형태에서, 화학식 V의 화합물과 화학식 VI의 화합물 또는 이의 염의 반응은 디클로로메탄 용매에서 수행된다.

[0112] 일부 실시형태에서, 본 방법은 화학식 I의 화합물을 아디프산과 반응시켜 화학식 I의 화합물의 아디페이트 염을 형성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0113] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서 하기 화학식 III의 화합물:



[0114]

[0115] III

[0116] 또는 이의 염을 4-피페리돈 또는 이의 염과 반응시켜 하기 화학식 V의 화합물:



[0117]

[0118] V

[0119] 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0120] 일부 실시형태에서, 4-피페리돈 또는 이의 염은 4-피페리돈 하이드로클로라이드이다. 일부 실시형태에서, 4-피페리돈 또는 이의 염은 4-피페리돈 하이드로클로라이드 일수화물이다.

[0121] 일부 실시형태에서, 4-피페리돈과 화학식 III의 화합물의 반응은 염기를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 염기는 탄산나트륨이다.

[0122] 일부 실시형태에서, 4-피페리돈과 화학식 III의 화합물의 반응은 디클로로메탄을 포함하는 용매 성분에서 수행된다.

[0123] 일부 실시형태에서, 4-피페리돈과 화학식 III의 화합물의 반응은 약 0°C 내지 약 5°C의 온도에서 수행된다.

[0124] 일부 실시형태에서, 화학식 III의 화합물은 하기 화학식 II의 화합물:



[0125]

[0126] II

[0127] 또는 이의 염을 옥살릴 클로라이드와 반응시켜 화학식 III의 화합물 또는 이의 염을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성된다.

[0128] 일부 실시형태에서, 옥살릴 클로라이드와 화학식 II의 화합물의 반응은 촉매량의 디메틸 포름아미드 (DMF)의 존

[0143] 일부 실시형태에서, 화학식 VI의 화합물 또는 이의 염은 2-(3-(4-(7H-피콜로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴 이염산염이다. 일부 실시형태에서, 반응은 적어도 2 당량의 제2 염기의 존재에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 제2 염기는 삼차 아민 (예를 들어, 트리에틸아민)이다.

[0144] 일부 실시형태에서, 화학식 VI의 화합물, 또는 이의 염에 기반하여 1 초과 당량의 화학식 V의 화합물이 사용된다.

[0145] 일부 실시형태에서, 화학식 V의 화합물과 화학식 VI의 화합물 또는 이의 염의 반응은 디클로로메탄 용매에서 수행된다.

[0146] 일부 실시형태에서, 본 방법은 화학식 I의 화합물을 아디프산과 반응시켜 화학식 I의 화합물의 아디페이트 염을 형성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0147] 일 양태에서, 하기 화학식 III의 화합물:



[0148] III

[0150] 또는 이의 염이 본 명세서에서 제공된다.

[0151] 용도

[0152] 화학식 I의 화합물인 {1-{1-[3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7H-피콜로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴은 JAK (예를 들어, JAK1, JAK2)의 억제제이다. JAK 억제제는 다양한 JAK-관련된 질환 또는 장애를 치료하는데 유용하다. JAK-관련된 질환의 예는, 예를 들어, 장기 이식 거부 (예를 들어, 동종이식편 거부반응 및 이식편 대 숙주 질환)를 비롯하여 면역계에 관련된 질환을 포함한다. JAK-관련된 질환의 추가의 예는 자가면역 질환 예컨대 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 소아 관절염, 건선성 관절염, 유형 I 당뇨병, 낭창, 건선, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 크론병, 중증 근무력증, 면역글로불린 신병증, 심근염, 자가면역 갑상선 장애, 만성적 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 및 기타 동종의 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환은 자가면역 수포성 피부 장애 예컨대 심상성 천포창 (PV) 또는 수포성 유천포창 (BP)이다.

[0153] JAK-관련된 질환의 추가의 예는 알러지성 병태 예컨대 천식, 음식 알러지, 습진성 피부염, 접촉 피부염, 아토피 피부염 (위축성 습진), 및 비염을 포함한다. JAK-관련된 질환의 추가의 예는 바이러스성 질환 예컨대 엡슈타인 바르 바이러스 (EBV), B형 간염, C형 간염, HIV, HTLV 1, 수두-대상포진 바이러스 (VZV) 및 인간 유두종 바이러스 (HPV)를 포함한다. JAK-관련된 질환의 추가의 예는 연골 변형, 예를 들어, 통풍 관절염, 패혈성 또는 감염성 관절염, 반응성 관절염, 반사성 교감신경 이상증, 동통성 영양장애, 티에체 증후군, 늑골 관절병증, 변형성 지방 병성 골관절염, 메셀레니병, 한디고두 질환, 섬유근육통에서 유래한 퇴행, 전신 홍반성 낭창, 경피증, 또는 간직 척추염과 관련된 질환을 포함한다.

[0154] JAK-관련된 질환의 추가의 예는 선천성 염색질용해, 연골이형성증, 및 가연골이형성증 (예를 들어, 마이크로티아, 에노티아, 및 골간단부 연골이형성증)을 비롯한 선천성 연골 기형을 포함한다.

[0155] JAK-관련된 질환 또는 병태의 추가의 예는 피부 장애 예컨대 건선 (예를 들어, 심상성 건선), 아토피 피부염, 피부 발진, 피부 자극, 피부 민감화 (예를 들어, 접촉 피부염 또는 알러지성 접촉 피부염)를 포함한다. 예를 들어, 국소적으로 적용될 때 일부 의약품을 포함한 특정 물질은 피부 민감화를 야기할 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치않는 민감화를 야기하는 제제와 함께 본 발명의 적어도 하나의 JAK 억제제의 공-투여 또는 순차적인 투여는 그와 같은 원치않는 민감화 또는 피부염을 치료하는데 도움이 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 피부 장애는 본 발명의 적어도 하나의 JAK 억제제의 국소 투여에 의해 치료된다.

[0156] JAK-관련된 질환 또는 병태의 추가의 예는 고형 종양 (예를 들어, 전립선암, 신장암, 간 암, 췌장 암, 위암, 유방암, 폐암, 두경부의 암, 갑상선암, 교묘세포종, 카포시 육종, 캐슬만병, 자궁 평활근육종, 흑색종 등), 혈액학적 암 (예를 들어, 림프종, 백혈병 예컨대 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML) 또는 다

발성 골수종), 및 피부암 예컨대 피부 T-세포 림프종 (CTCL) 및 피부 B-세포 림프종을 특징으로 하는 것들을 포함한다. 실시예 CTCL은 세자리 증후군 및 균상식육종을 포함한다. JAK-관련된 질환 또는 병태의 다른 예는 폐동맥 고혈압을 포함한다.

[0157] JAK-관련된 질환 또는 병태의 다른 예는 염증-관련된 암을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암은 염증성 장 질환과 관련된다. 일부 실시형태에서, 염증성 장 질환은 궤양성 대장염이다. 일부 실시형태에서, 염증성 장 질환은 크론병이다. 일부 실시형태에서, 염증-관련된 암은 결장암-관련된 암이다. 일부 실시형태에서, 염증-관련된 암은 결장암 또는 결장직장암이다. 일부 실시형태에서, 암은 위암, 위장 유암종, 위장 간질성 종양 (GIST), 선암종, 소장 암, 또는 직장암이다.

[0158] JAK-관련된 질환은 추가로 하기 발현을 특징으로 하는 것들을 포함할 수 있다: JAK2 돌연변이체 예컨대 슈도-키나제 도메인에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 것들 (예를 들어, JAK2V617F); 슈도-키나제 도메인의 외측에 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 JAK2 돌연변이체; JAK1 돌연변이체; JAK3 돌연변이체; 에리트로포이에틴 수용체 (EPOR) 돌연변이체; 또는 CRLF2의 탈조절된 발현.

[0159] JAK-관련된 질환은 추가로 골수증식성 장애 (MPD) 예컨대 진성 적혈구증가증 (PV), 본태성 혈소판증가증 (ET), 골수성 화생이 있는 골수섬유증 (MMM), 일차 골수섬유증 (PMF), 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 골수단핵구성 백혈병 (CMML), 호산구과다 증후군 (HES), 전신 비만 세포 질환 (SMCD), 및 기타 동종의 것들을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 골수증식성 장애는 골수섬유증 (예를 들어, 일차 골수섬유증 (PMF) 또는 후 진성 적혈구증가증/본태성 혈소판증가증 골수섬유증 (후-PV/후-ET MF))이다. 일부 실시형태에서, 골수증식성 장애는 후-본태성 혈소판증가증 골수섬유증 (후-ET MF)이다. 일부 실시형태에서, 골수증식성 장애는 후 진성 적혈구증가증 골수섬유증 (후-PV MF)이다.

[0160] JAK-관련된 질환 또는 병태의 다른 예는 본 발명의 화합물의 투여에 의해 다른 의약품의 피부과 부작용을 개선하는 것을 포함한다. 예를 들어, 수많은 약제학적 제제는 여드름모양 발진 또는 관련된 피부염으로 명백할 수 있는 원치않는 알러지성 반응을 초래한다. 그와 같은 바람직하지 않은 부작용을 갖는 실시예 약제학적 제제는 항암 약물 예컨대 게피티닙, 세툽시맵, 예틀로티닙, 및 기타 동종의 것들을 포함한다. 본 발명의 화합물은 바람직하지 않은 피부과 부작용을 갖는 약제학적 제제와 조합하여 (예를 들어, 동시에 또는 순차적으로) 전신으로 또는 국소적으로 (예를 들어, 피부염의 부근에 국소화됨) 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 다른 의약품과 함께 국소적으로 투여될 수 있으며, 여기서 상기 다른 의약품은 본 발명의 화합물의 부재에서 국소적으로 적용될 때 접촉 피부염, 알러지성 접촉 민감화, 또는 유사한 피부 장애를 야기한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 화합물 및 피부염, 피부 장애, 또는 관련된 부작용을 야기할 수 있는 추가의 약제학적 제제를 함유하는 국소 제형을 포함한다.

[0161] 추가의 JAK-관련된 질환은 염증 및 염증성 질환을 포함한다. 예시적인 염증성 질환은 유육종증, 눈의 염증성 질환 (예를 들어, 홍채염, 포도막염, 공막염, 결막염, 또는 관련된 질환), 기도의 염증성 질환 (예를 들어, 코 및 부비강을 포함한 상부 기도 예컨대 비염 또는 부비강염 또는 기관지염, 만성적 폐쇄성 폐 질환, 및 기타 동종의 것들을 포함한 하부 기도), 염증성 근병증 예컨대 심근염, 및 다른 염증성 질환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 눈의 염증 질환은 눈꺼풀염이다.

[0162] 추가의 JAK-관련된 질환은 염증성 허혈성 사건 예컨대 뇌졸중 또는 심장 정지에 관련된 허혈 재관류 손상 또는 질환 또는 병태, 내독소-유도된 질환 상태 (예를 들어, 바이패스 수술 후 합병증 또는 만성 심부전에 기여하는 만성 내독소 상태), 식욕부진, 악액질, 피로 예컨대 암으로부터 유래하거나 이와 관련된 것, 재협착증, 피부경화증, 섬유증, 저산소증 또는 성장교세포증과 관련된 병태 예컨대, 예를 들어, 당뇨 망막병증, 암, 또는 신경퇴행, 및 다른 염증성 질환 예컨대 전신 염증 반응 증후군 (SIRS) 및 패혈성 쇼크를 포함한다. 다른 JAK-관련된 질환은, 예를 들어, 양성 전립선 비대 또는 양성 전립선 과다형성에 기인한 통풍 및 증가된 전립선 크기, 뿐만 아니라 골 흡수 질환 예컨대 골다공증 또는 골관절염, 호르몬 불균형 및/또는 호르몬 요법, 자가면역 질환 (예를 들어 골성 유육종증), 또는 암 (예를 들어 골수종)과 관련된 골 흡수 질환을 포함한다.

[0163] 추가의 JAK-관련된 질환은 안구 건조 장애를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "안구 건조 장애"는 안구 건조를 "안구 표면에 잠재적 손상을 갖는 불편 증상, 시각 장애, 및 눈물막 불안정을 초래하는 눈물 및 안구 표면의 다인 질환으로 정의한, 안구 건조 워크샵 (DEWS: Dry Eye Workshop)의 최근 공식 보고에서 요약된 질환 상태를 포괄하는 것으로 의도된다. 이것은 눈물 막의 증가된 삼투질농도와 안구 표면의 염증을 동반한다". 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, Lemp, "The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", *The*

Ocular Surface, 5(2), 75-92 April 2007 참고. 일부 실시형태에서, 안구 건조 장애는 눈물-결핍된 안구 건조 (ADDE) 또는 증발성 안구 건조 장애, 또는 적절한 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 안구 건조 장애는 쇼그렌 증후군 안구 건조 (SSDE)이다. 일부 실시형태에서, 안구 건조 장애는 비-쇼그렌 증후군 안구 건조 (NSSDE)이다.

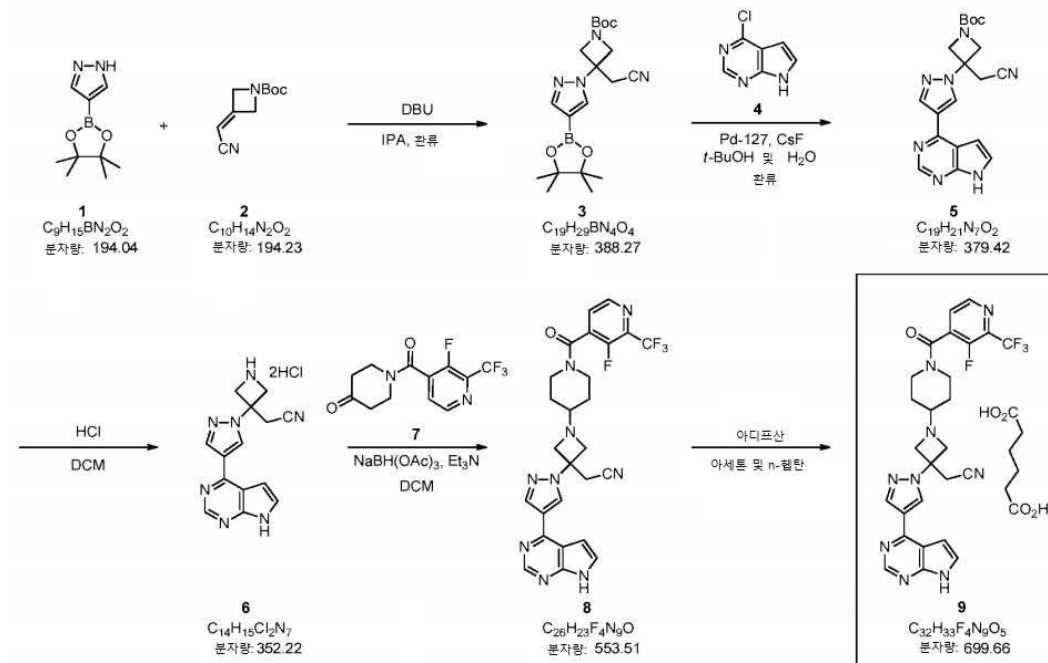
[0164] 추가의 JAK-관련된 질환은 결막염, 포도막염 (만성 포도막염을 포함함), 맥락막염, 망막염, 모양체염, 공막염, 상공막염, 또는 홍채염을 포함한다. 다른 JAK-관련된 질환은 바이러스성 감염, 예컨대 인플루엔자 및 SARS와 관련된 호흡 기능이상 또는 부전을 포함한다.

[0165] 실시예

[0166] 본 발명은 특정 실시예의 방식에 의해 보다 상세하게 기술될 것이다. 하기 실시예는 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명을 어떠한 방식으로든 한정하려는 것은 아니다. 당업자는 본질적으로 동일한 결과를 생성하도록 변화되거나 변형될 수 있는 다양한 비임계 파라미터를 쉽게 인식할 것이다.

[0167] 실시예 1. 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아세트딘-3-일)아세토니트릴 아디페이트 (9)의 합성

[0168] 반응식 I



[0169]

[0170] *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)아세트딘-1-카복실레이트 (3). 질소 유입구, 열전쌍, 및 기계적 교반기가 장착된 1-L 플라스크에 이소프로판올 (IPA, 200 mL), 1,8-디아자바이사이클로[5.4.0]운데크-엔 (DBU, 9.8 g, 64.4 mmol, 0.125 당량), 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1, 101 g, 520.51 mmol, 1.01 당량) 및 *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아세트딘-1-카복실레이트 (2, 100 g, 514.85 mmol)를 주위 온도에서 순차적으로 첨가하여 반응 혼합물을 현탁액으로 생성하였다. 수득한 반응 혼합물을 30분 내에 가열 환류하여 균질한 용액을 제공하고 혼합물은 추가의 2 - 3시간 동안 환류에서 유지하였다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 후, 혼합물을 환류에서 유지하면서 *n*-헵탄 (400 mL)을 45분간 서서히 반응 혼합물에 첨가하였다. *n*-헵탄 첨가 동안 고체가 침전되었다. *n*-헵탄 첨가가 완료되면, 혼합물을 주위 온도로 서서히 냉각시키고 주위 온도에서 추가 1시간 동안 교반하였다. 고체는 여과에 의해 수집하고, *n*-헵탄 (200 mL)으로 세정하고, 일정한 중량으로 질소 스위핑하면서 50°C에서 진공하에서 건조시켜 *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)아세트딘-1-카복실레이트 (3, 181 g, 이론치 199.9 g, 90.5%)를 백색 내지 옅은 황색 고체로 얻었다. 3 경우: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 4.45 - 4.23 (m, 2H), 4.23 - 4.03 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.25 (s, 12H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.34, 145.50, 135.88, 116.88,

107.08 (br), 83.15, 79.36, 58.74 (br), 56.28, 27.96, 26.59, 24.63 ppm; C₁₉H₂₉BN₄O₄ (MW 388.27), LCMS (EI) *m/e* 389 (M⁺ + H).

[0171] ***tert*-부틸 3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)-3-(시아노메틸)-아제티딘-1-카복실레이트 (5)**. 질소 유입구, 열전쌍, 및 기계적 교반기가 장착된 1-L 플라스크에 4-클로로-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘 (4, 39.6 g, 257.6 mmol), *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1*H*-피라졸-1-일)아제티딘-1-카복실레이트 (3, 100 g, 257.6 mmol, 1.0 당량), 세슘 플루오라이드 (136.9 g, 901.4 mmol, 3.5 당량), *tert*-부탄올 (250 mL), 물 (250 mL), 및 [1,1'-비스(디-사이클로헥실포스포노)페로센]디클로로팔라듐(II) (Pd-127, 351.4 mg, 0.46 mmol, 0.0018 당량)을 주위 온도에서 첨가하였다. 수득한 반응 혼합물은 탈가스되고 가열 환류하기 전에 3회 질소로 재충전되고 20 - 24시간 동안 질소 하에서 환류에서 유지되었다. HPLC가 반응이 완료된 것을 나타낼 때, 반응 혼합물을 30분 내에 45 - 55°C로 냉각시키고, 2개의 상을 분리하고, 수성상을 버렸다. 유기상에 30분 내에 45 - 55°C에서 *n*-헵탄 (125 mL)을 첨가하였다. 수득한 혼합물을 1시간 내에 주위 온도로 서서히 냉각시키고 추가의 2시간 동안 주위 온도에서 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고, *n*-헵탄 (100 mL)으로 세정하고, 일정한 중량으로 질소 스위핑하면서 50°C에서 진공 하에서 건조시켜 *tert*-부틸 3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)-3-(시아노메틸)-아제티딘-1-카복실레이트 (5, 96.8 g, 이론치 97.7 g, 99%)를 얻은 황색 고체로 얻었다. 5 경우: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.62 - 4.41 (m, 2H), 4.31 - 4.12 (m, 2H), 3.67 (s, 2H), 1.39 (s, 9H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.40, 152.60, 150.63, 149.15, 139.76, 129.53, 127.65, 122.25, 116.92, 113.21, 99.71, 79.45, 58.34 (br), 56.80, 27.99, 26.83 ppm; C₁₉H₂₁N₇O₂ (MW 379.4), LCMS (EI) *m/e* 380 (M⁺ + H).

[0172] **2-(3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 이염산염 (6)**. 질소 유입구, 열전쌍, 추가의 깔때기, 및 기계적 교반기가 장착된 0.5-L 플라스크에 *tert*-부틸 3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)-3-(시아노메틸)아제티딘-1-카복실레이트 (5, 15 g, 39.5 mmol), 물 (7.5 mL, 416 mmol) 및 디클로로메탄 (75 mL)을 실온에서 첨가했다. 혼합물은 실온에서 교반하여 현탁액을 생성했다. 본 현탁액에 5분 내에 이소프로판올 (55 mL, 275 mmol, 7.0 당량) 내 5 M 염화수소 (HCl)의 용액을 첨가했다. 수득한 반응 혼합물은 그 다음 온화한 환류로 가열하고 환류에서 3-4시간 동안 유지했다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 후, *tert*-부틸 메틸 에테르 (TBME, 45 mL)를 반응 현탁액에 첨가하였다. 혼합물을 서서히 실온으로 냉각시키고, 추가의 1시간 동안 교반했다. 고체는 여과로 수집하고, *tert*-부틸 메틸 에테르 (TBME, 45 mL)로 세정하고 일정한 중량으로 질소 스위핑하면서 50°C에서 진공 하에서 건조시켜 2-(3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 이염산염 (6, 13.6 g, 이론치 13.9 g, 98%)을 황백색 내지 밝은 황색 고체로 얻었다. 6 경우: ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.96 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 4.74 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 3.74 (s, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 151.35, 143.75, 143.33, 141.33, 132.03, 131.97, 115.90, 114.54, 113.85, 103.18, 59.72, 54.45 (2C), 27.02 ppm; C₁₄H₁₅Cl₂N₇ (C₁₄H₁₃N₇ for 유리 염기, MW 279.30), LCMS (EI) *m/e* 280 (M⁺ + H).

[0173] **2-(3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (8, 유리 염기)**. 질소 유입구, 열전쌍, 추가의 깔때기, 및 기계적 교반기가 장착된 0.5-L 플라스크에 2-(3-(4-(7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-1*H*-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 이염산염 (6, 20 g, 56.78 mmol), 디클로로메탄 (200 mL) 및 트리에틸아민 (TEA, 16.62 mL, 119.2 mmol, 2.1 당량)을 주위 온도에서 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 주위 온도에서 교반하고 그 다음 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7, 17.15 g, 57.91 mmol, 1.02 당량)을 혼합물에 첨가하였다. 그 다음 혼합물을 5분 내에 주위 온도 (26°C 아래)에서 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드 (25.34 g, 113.6 mmol, 2.0 당량)로 처리하였다. 수득한 반응 혼합물은 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 후, 반응 혼합물은 포화된 NaHCO₃ 수용액 (200 mL)으로 쉐킷하였다. 2개의 상을 분리하고 수성상은 메틸렌 클로라이드 (200 mL)로 추출하였다. 조합된 유기상은 4% 염수 (100 mL)로 세정하고 이어서 용매를 증류에 의해 아세톤으로 메틸렌 클로라이드를 교체했다. 아세톤 내 원하는 조 성

성물 (8)의 수득한 용액을 후속적인 아디페이트 염 형성을 위해 직접적으로 사용하였다. 용액의 작은 일부분을 칼럼 크로마토그래피 (SiO₂, EtOAc 구배 용출에서 0 - 10%의 MeOH)로 정제하여 분석적으로 순수한 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴 (8 유리 염기)을 황백색 고체로 얻었다. 8 경우: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.70 (m, 2H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.6, 1.7 Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.78 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.61 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.28 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 3.09 (ddd, J = 13.2, 9.5, 3.1 Hz, 1H), 2.58 (m, 1H), 1.83 - 1.75 (m, 1H), 1.70 - 1.63 (m, 1H), 1.35 - 1.21 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 160.28, (153.51, 150.86), 152.20, 150.94, 149.62, (146.30, 146.25), 139.48, (134.78, 134.61), (135.04, 134.92, 134.72, 134.60, 134.38, 134.26, 134.03, 133.92), 129.22, 127.62, 126.84, 121.99, 122.04, (124.77, 122.02, 119.19, 116.52), 117.39, 113.00, 99.99, 61.47, 60.49, 57.05, 44.23, 28.62, 27.88, 27.19 ppm; C₂₆H₂₃F₄N₉O (MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.1 (M⁺ + H).

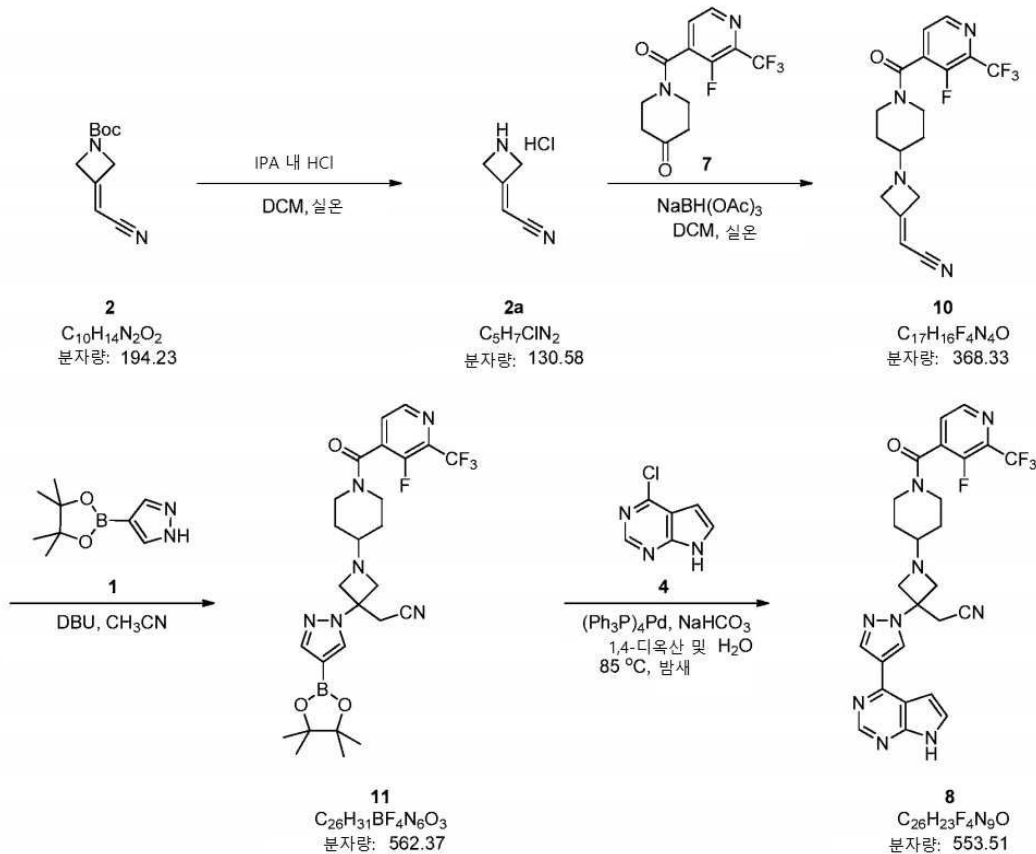
[0174]

2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴 아디페이트 (9). 기계적 교반기, 열전쌍, 투입 깔때기, 및 질소 유입구가 장착된 0.5-L 플라스크에 아세톤 (220 mL) 및 아디프산 (8.7 g, 59.53 mmol, 1.05 당량) 내 조 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴 (8 유리 염기, 31.38 g, 56.7 mmol)의 용액을 주위 온도에서 첨가했다. 그 다음 반응 혼합물을 가열 환류하여 용액을 얻었다. n-헵탄 (220 mL)을 1시간 내에 40 - 50 °C에서 서서히 반응 혼합물에 첨가하였다. 수득한 혼합물은 1시간 내에 주위 온도로 서서히 냉각시키고 추가의 16시간 동안 주위 온도에서 교반했다. 고체는 여과로 수집하고, n-헵탄 (2 X 60 mL)으로 세정하고, 일정한 중량으로 질소 스위핑하면서 50 °C에서 진공 하에서 건조시켜 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴 아디페이트 (9, 34.0 g, 이론치 39.7 g, 2 단계들에 대해 85.6%)를 백색 내지 황백색 고체로 얻었다. 9: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.16 (s, 1H), 12.05 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.69 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 3.6, 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.6, 1.7 Hz, 1H), δ 4.11 (dt, J = 11.0, 4.4 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 3.60 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.44 (dt, J = 14.4, 4.6 Hz, 1H), 3.28 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.09 (ddd, J = 13.2, 9.6, 3.2 Hz, 1H), 2.58 (tt, J = 8.6, 3.5 Hz, 1H), 2.28 - 2.17 (m, 4H), 1.83 - 1.74 (m, 1H), 1.67 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 1.59 - 1.46 (m, 4H), 1.37 - 1.21 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 174.38, 160.29, (153.52, 150.87), 152.20, 150.94, 149.63, (146.30, 146.25), 139.48, (134.79, 134.62), (135.08, 134.97, 134.74, 134.62, 134.38, 134.28, 134.04, 133.93), 129.21, 127.62, 126.84, 122.05, (124.75, 122.02, 119.29, 116.54), 117.39, 113.01, 99.99, 61.47, 60.50, 57.06, 44.24, 33.42, 30.70, 28.63, 27.89, 27.20, 24.07 ppm; C₃₂H₃₃F₄N₉O₅ (MW 699.66; 유리 염기에 대해 C₂₆H₂₃F₄N₉O, MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.0 (M⁺ + H).

[0175]

실시예 2: 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세토니트릴의 대안적인 합성

[0176] 반응식 II



[0177]

[0178]

2-(아제티딘-3-일리덴)아세트니트릴 하이드로클로라이드 (2a). 질소 유입구, 열전쌍, 및 기계적 교반기가 장착된 0.5-L 플라스크에 *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카복실레이트 (**2**, 30 g, 154.46 mmol) 및 메틸렌클로라이드 (300 mL)를 주위 온도에서 첨가했다. 그 다음 용액을 이소프로판올 용액 (294.2 mL, 1.54 mol, 10 당량) 내 5 M 염화수소 (HCl)의 용액으로 주위 온도에서 처리하고 수득한 반응 혼합물을 주위 온도에서 18시간 동안 교반했다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 후, 현탁액을 *tert*-부틸 메틸 에테르 (TBME, 150 mL)에 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 주위 온도에서 교반했다. 고체를 여과로 수집하고, *n*-헵탄 (2 X 100 mL)으로 세정하고, 여과 깔때기 상에서 주위 온도에서 3시간 동안 건조시켜 2-(아제티딘-3-일리덴)아세트니트릴 하이드로클로라이드 (**2a**, 13.7 g, 이론치 20.2 g, 67.8 %)를 백색 고체로서 얻었다. **2a** 경우: 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9.99 (s, 2H), 5.94 (p, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.85 - 4.80 (m, 2H), 4.77 - 4.71 (m, 2H) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.65, 114.54, 94.78, 55.26, 54.63 ppm; $C_5H_7ClN_2$ (MW 130.58; 유리 염기에 대해 $C_5H_6N_2$, MW 94.11), LCMS (EI) m/e 95 ($M^+ + H$).

[0179]

2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일리덴)아세트니트릴 (10). 질소 유입구, 열전쌍, 및 자석 교반기가 장착된 0.25-L 플라스크에 2-(아제티딘-3-일리덴)아세트니트릴 하이드로클로라이드 (**2a**, 4.5 g, 34.46 mmol), 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (**7**, 10 g, 34.46 mmol, 1.0 당량), 및 메틸렌클로라이드 (100 mL)를 주위 온도에서 첨가하고, 그 다음 수득한 혼합물을 나트륨 트리야세톡시보로하이드라이드 (14.6 g, 68.93 mmol, 2.0 당량)로 주위 온도에서 처리하였다. 반응 혼합물은 포화된 중탄산나트륨 ($NaHCO_3$) 수용액 (50 mL)으로 켄칭하기 전에 주위 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 2개의 상을 분리하고 수성상을 디클로로메탄 (200 mL)으로 추출하였다. 조합된 유기상은 물 (50 mL) 및 염수 (50 mL)로 세정하고 감압 하에서 농축하여 원하는 조 생성물 (**10**)을 얻고, 이것을 칼럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 헥산 구배 용출 내 0 - 10%의 에틸 아세이트)로 정제하여 2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일리덴)아세트니트릴 (**10**, 9.5 g, 이론치 12.7 g, 74.8 %)을 백색 고체로서 얻었다. **10** 경우: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.57 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 4.6$ Hz,

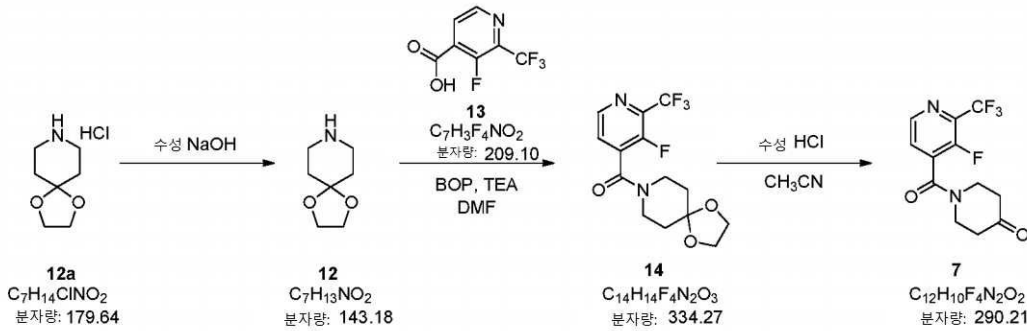
1H), 5.29 (p, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.18 - 4.08 (m, 1H), 4.08 - 4.03 (m, 2H), 3.98 - 3.94 (m, 2H), 3.57 - 3.39 (m, 2H), 3.17 - 3.04 (m, 1H), 2.56 (tt, $J = 7.4, 3.5$ Hz, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 1H), 1.75 - 1.64 (m, 1H), 1.54 - 1.43 (m, 1H), 1.43 - 1.31 (m, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 161.34, 160.73, 152.62 (d, $J = 269.1$ Hz), 145.75 (d, $J = 6.1$ Hz), 136.73 (qd, $J = 36.1, 12.0$ Hz), 134.56 (d, $J = 16.9$ Hz), 126.89, 120.58 (qd, $J = 275.0, 4.9$ Hz), 115.11, 92.04, 62.05, 60.57 (2C), 44.47, 39.42, 29.38, 28.47 ppm; $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}$ (MW 368.33), LCMS (EI) m/e 369 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

[0180] 2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (11). 질소 유입구, 열전쌍, 및 자석 교반기가 장착된 25 mL 플라스크에 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1, 210 mg, 1.08 mmol, 1.08 당량), 2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)리텐)아세트니트릴 (10, 370 mg, 1.0 mmol) 및 아세트니트릴 (3 mL)을 주위 온도에서 첨가했다. 그 다음 용액을 1,8-디아자바이사이클로[5.4.0]운데칸-엔 (DBU, 173 mg, 0.17 mL, 1.12 mmol, 1.12 당량)으로 주위 온도에서 처리하고 수득한 반응 혼합물은 50°C로 가온시키고 50°C에서 밤새 교반했다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 때, 반응 혼합물은 크로마토그래피 정제 (에틸 아세테이트 구배 용출 내 0 - 2.5% MeOH)를 위해 솔리카 겔 (SiO_2) 컬럼 상에 직접적으로 로딩하여 2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (11, 263 mg, 이론치 562.4 mg, 46.7 %)을 백색 고체로서 얻었다. 11 경우: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.64 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 4.10 - 3.99 (m, 1H), 3.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.52 - 3.42 (m, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.41 - 3.33 (m, 1H), 3.28 - 3.15 (m, 1H), 3.03 (ddd, $J = 12.9, 9.2, 3.2$ Hz, 1H), 2.51 - 2.44 (m, 1H), 1.77 - 1.66 (m, 1H), 1.64 - 1.54 (m, 1H), 1.28 - 1.17 (m, 2H), 1.24 (s, 12H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.22, 152.13 (d, $J = 265.8$ Hz), 146.23 (d, $J = 5.7$ Hz), 145.12, 135.41, 134.66 (d, $J = 16.9$ Hz), 134.43 (qd, $J = 35.0, 11.7$ Hz), 127.58, 120.61 (qd, $J = 274.4, 4.6$ Hz), 117.35, 106.59 (br), 83.10, 61.40, 60.53 (2C), 56.49, 44.17, 38.99, 28.55, 27.82, 27.02, 24.63 ppm; $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BF}_4\text{N}_6\text{O}_3$ (MW 562.37), LCMS (EI) m/e 563 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

[0181] 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (8). 질소 유입구, 열전쌍, 추가의 깔때기, 및 자석 교반기가 장착된 25-mL 플라스크에 2-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)-3-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (11, 307 mg, 0.546 mmol), 4-클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘 (4, 84.8 mg, 0.548 mmol, 1.0 당량), 중탄산나트륨 (NaHCO_3 , 229 mg, 2.72 mmol, 5.0 당량), 물 (1.6 mL), 및 1,4-디옥산 (1.6 mL)을 주위 온도에서 첨가했다. 그 다음 혼합물을 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0) (12.8 mg, 0.011 mmol, 0.02 당량)으로 주위 온도에서 처리하고 수득한 반응 혼합물은 탈가스하고 85°C로 가열하기 전에 3회 질소로 재충전하였다. 반응 혼합물은 85°C에서 질소 하에서 밤새 교반했다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 때, 반응 혼합물은 감압 하에서 농축 건조시키고 원하는 생성물인, 2-(3-(4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일)-1-(1-(1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-일)아제티딘-3-일)아세트니트릴 (8 유리 염기, 135 mg, 이론치 302.2 mg, 44.6 %)을 건조된 반응 혼합물의 직접적인 실리카겔 (SiO_2) 컬럼 크로마토그래피 (헥산 구배 용출 내 0 - 10%의 에틸 아세테이트) 정제에 의해 황백색 고체로 수득하였다. 이 합성 접근법에 의해 수득된 화합물은 실시예 1에서 상술된 바와 같은 합성 방법에 의해 제조된 화합물 8에 대해 모든 비교할만한 양태에서 동일하다.

[0182] 실시예 3. 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7)의 합성

[0183] 반응식 III



[0184]

[0185]

(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]데칸-8-일)메탄온 (14). 기계적 교반기, 투입 깔때기 및 격막이 장착된 30 L 반응기에 수산화나트륨 (NaOH, 1.4 kg, 35 mol, 2.0 당량) 및 물 (7 L)을 충전하고 수득한 용액을 1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]데칸 하이드로클로라이드 (3.13 kg, 17.43 mol)로 주위 온도에서 처리하였다. 그 다음 수득한 혼합물을 고체 염화나트륨 (1.3 kg)으로 포화하기 전에 주위 온도에서 30분 동안 교반하고 2-메틸-테트라하이드로푸란 (3 x 7 L)으로 추출하였다. 조합된 유기상을 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄, 1.3 kg)으로 건조시키고 여과에 의해 건조 시약인, 황산나트륨 (Na₂SO₄)의 제거 후 감압 (70 mmHg) 하에서 50°C에서 농축하였다. 이렇게 수득된 황색 오일을 감압 (80 mmHg, bp 115 내지 120°C) 하에서 증류하여 1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]데칸 (2.34 kg, 이론치 2.496 kg, 93.8%)를 맑은 오일로서 얻고, 이것을 후속적인 커플링 반응에 직접적으로 사용하였다.

[0186]

기계적 교반기, 투입 깔때기, 온도계 및 진공 배출구가 장착된 건조된 100 L 반응기에 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코틴산 (13, 3.0 kg, 14.35 mol), 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP 시약, 7.6 kg, 17.2 mol, 1.2 당량), 1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]데칸 (2.34 kg, 16.36 mol, 1.14 당량) 및 *N,N*-디메틸포름아미드 (DMF, 18 L)를 주위 온도에서 충전하였다. 그 다음 수득한 용액을 5 내지 10°C로 냉각시키기 전에 주위 온도에서 20분 동안 교반하였다. 트리에틸아민 (Et₃N, 4 L, 28.67 mol, 2.0 당량)을 그 다음 반응 혼합물에 1시간에 걸쳐 첨가하고 트리에틸아민의 첨가 동안 내부 온도를 5°C 내지 10°C 사이로 유지시켰다. 이렇게 수득된 어두운 갈색 용액을 12시간 동안 주위 온도 (대략 20°C)에서 교반하고 그 다음 10°C 부근으로 냉각시켰다. 격렬한 교반과 함께, 18 L의 포화된 중탄산나트륨 (NaHCO₃) 수용액 및 36 L의 물을 냉각된 반응 혼합물에 순차적으로 첨가하고 내부 온도를 15°C 이하로 유지시켰다. 이렇게 수득된 침전 (필터 케이크)을 여과로 수집하였다. 수성상은 그 다음 12 kg의 고체 염화나트륨 (NaCl)으로 포화하고 EtOAc (2 x 18 L)로 추출하였다. 조합된 유기층은 포화된 중탄산나트륨 (NaHCO₃) 수용액 (18 L), 및 물 (2 x 18 L)로 연속적으로 세정하였다. 수집된 필터 케이크는 그 다음 유기상에 다시 용해하고 수득한 어두운 갈색 용액을 감압 (40 - 50°C, 30 mm Hg) 하에서 농축하기 전에 물 (2 x 18 L)로 세정하여 대략 5.0 kg의 원하는 조 생성물 (14)을 점성 갈색 오일로 얻었다. 상기에 수득된 조 생성물은 그 다음 50°C에서 EtOH (8.15 L)에 용해시키고 수득한 용액을 50°C 부근에서 30분에 걸쳐 물 (16.3 L)로 처리하였다. 3시간에 걸쳐 교반하면서 주위 온도 (대략 20°C)로 서서히 냉각시키기 전에 갈색 용액을 씨딩하고 주위 온도에서 12시간 동안 교반했다. 고체를 여과로 수집하고, EtOH 및 물 (EtOH : H₂O = 1 : 20, 2 L)의 혼합물로 세정하고 감압 (50 mmHg) 하에서 대략 60°C에서 24시간 동안 건조시켜 (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]데칸-8-일)메탄온 (14, 3.98 kg, 이론치 4.797 kg, 83.0%)을 백색 고체로서 얻었다. 14 경우: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (d, ³J_{HH} = 4.68 Hz, 1H, 피리딘 내 NCH), 7.92 (dd, ³J_{HH} = 4.68 Hz, ⁴J_{HF} = 4.68 Hz, 1H, 피리딘 내 NCCH), 3.87 - 3.91 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.70 (br s, 2H, 피페리딘 고리 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 축 위치에서 둘 모두), 3.26 (t, ³J_{HH} = 5.86 Hz, 2H, 피페리딘 고리 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 적도방향 위치에서 둘 모두), 1.67 (d, ³J_{HH} = 5.86 Hz, 2H, 피페리딘 고리 내 NCCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCCH₂ 중 하나, 적도방향 위치에서 둘 모두), 1.58 (br s, 2H, 피페리딘 고리 내 NCCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCCH₂ 중 하나, 축 위치에서 둘 모두)

ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.03 (N-C=O), 151.16 (d, ¹J_{CF} = 266.03 Hz, C-F), 146.85 (d, ⁴J_{CF} = 4.32 Hz, 피리딘 내 NCH), 135.24 (d, ²J_{CF} = 11.51 Hz, C-C=O), 135.02 (사중항, ²J_{CF} = 34.57 Hz, NCCF₃), 128.24 (d, ⁴J_{CF} = 7.48 Hz, 피리딘 내 NCCH), 119.43 (d X 사중항, ¹J_{CF} = 274.38 Hz, ³J_{CF} = 4.89 Hz, CF₃), 106.74 (OCO), 64.60 (OCCO), 45.34 (피페리딘 고리 내 NC), 39.62(피페리딘 고리 내 NC), 34.79(피페리딘 고리 내 NCC), 34.10 (피페리딘 고리 내 NCC) ppm; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.69 (d, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, F₃C), -129.26 (d X 사중항, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, ⁴J_{FH} = 3.96 Hz, FC) ppm; C₁₄H₁₄F₄N₂O₃ (MW, 334.27), LCMS (EI) *m/e* 335.1 (M⁺ + H).

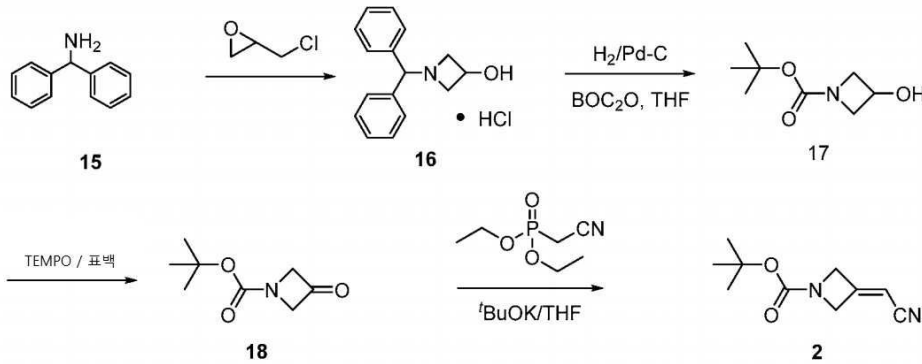
[0187]

1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7). 기계적 교반기, 열전쌍, 투입 깔때기 및 질소 유입구가 장착된 5 L 4-구의 둥근바닥 플라스크에 아세토니트릴 (ACN, 400 mL) 내 (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(1,4-디옥사-8-아자스피로[4,5]테칸-8-일)메탄온 (**14**, 100 g, 0.299 mol)을 주위 온도에서 증진했다. 수득한 용액은 내부 온도를 10°C 아래로 유지하면서 6.0 N 수성 염산 (HCl) 용액 (450 mL, 2.70 mol, 9.0 당량)으로 처리하기 전에 10°C 아래로 냉각시켰다. 수득한 반응 혼합물을 그 다음 서서히 실온으로 가온시키고 6.0 N 수성 염산 (HCl) 용액 (1050 mL, 6.30 mol, 21.0 당량)의 추가의 양을 투입 깔때기를 통해 주위 온도에서 8시간에 걸쳐 반응 혼합물에 느리게 도입하였다. HPLC에 의한 모니터링으로 반응이 완료된 때, 그 다음 반응 혼합물은 내부 온도를 10°C 아래로 유지하면서 30% 수성 수산화나트륨 (NaOH, 860 mL, 8.57 mmol, 28.6 당량)으로 처리하기 전에 0°C로 냉각시켰다. 수득한 반응 혼합물은 1시간에 걸쳐 고체 중탄산나트륨 (NaHCO₃, 85.0 g, 1.01 mol, 3.37 당량)의 첨가 전에 후속으로 주위 온도로 가온하였다. 그 다음 혼합물을 EtOAc (2 x 1.2 L)로 추출하고, 조합된 유기상은 16% 수성 염화나트륨 용액 (2 x 800 mL)으로 세정하고 진공 증류에 의해 대략 1.0 L로 농축하였다. *n*-헵탄 (2.1 L)을 잔류물에 첨가하고, 수득한 혼합물은 진공 증류에 의해 1.0 L로 농축하였다. 농축된 혼합물에 *n*-헵탄 (2.1 L)을 첨가했다. 수득한 백색 슬러리를 그 다음 진공 증류에 의해 1.0 L로 농축하였다. 백색 슬러리에 그 다음 메틸 *tert*-부틸 에테르 (MTBE, 1.94 L)를 첨가했다. 탁한 백색을 40°C로 가열시켜 맑은 용액을 얻었다. 수득한 용액을 진공 증류에 의해 약 1.0 L로 농축하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 백색 침전물을 여과로 수집하고, *n*-헵탄 (400 mL)으로 세정하고 흡인 진공과 함께 질소 하에서 필터 상에서 건조시켜 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (**7**, 78.3 g, 90.2% 수율로 수득한 이론치 86.8 g, 및 HPLC에 의해 측정된 98% 순도)을 황백색 고체로 얻었다. **7** 경우: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.68 (d, ³J_{HH} = 4.69 Hz, 1H, 피리딘 내 NCH), 7.97 (dd, ³J_{HH} = 4.69 Hz, ⁴J_{HF} = 4.69 Hz, 1H, 피리딘 내 NCCH), 3.92 (br s, 2H, 피페리딘 고리 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 축 위치에서 둘 모두), 3.54 (t, ³J_{HH} = 6.15 Hz, 2H, 피페리딘 고리 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 적도방향 위치에서 둘 모두), 2.48 (t, ³J_{HH} = 6.44 Hz, 2H, NCCH₂), 2.34 (t, ³J_{HH} = 6.15 Hz, 2H, NCCH₂) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, ¹J_{CF} = 266.89 Hz, C-F), 146.90 (d, ⁴J_{CF} = 6.05 Hz, 피리딘 내 NCH), 135.56 (C-C=O), 134.78 -135.56 (m, NCCF₃), 128.27 (d, ³J_{CF} = 7.19 Hz, 피리딘 내 NCCH), 119.52 (d X 사중항, ¹J_{CF} = 274.38 Hz, ³J_{CF} = 4.89 Hz, CF₃), 45.10 (피페리딘 고리 내 NC) ppm, (CD₃)₂S₂O와 증침에 기인한 하나의 탄소 (피페리딘 고리 내 NCC) 누락; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.58 (d, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, F₃C), -128.90 (d X 사중항, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, ⁴J_{FH} = 4.05 Hz, FC) ppm; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (MW, 290.21), LCMS (EI) *m/e* 291.1 (M⁺ + H).

[0188]

실시예 4. *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아세트산-1-카복실레이트의 합성

[0189] 반응식 IV



[0190]

[0191] **1-벤즈하이드릴아제티딘-3-올 하이드로클로라이드 (16).** 메탄올 (MeOH, 6 L) 내 디페닐메탄아민 (2737 g, 15.0 mol, 1.04 당량)의 용액을 주위 온도에서 투입 깔때기로부터 2-(클로로메틸)옥시란 (1330 g, 14.5 mol)으로 처리하였다. 초기 첨가 동안 완만한 흡열이 감지되었다. 수득한 반응 혼합물은 추가의 3일 동안 환류로 가온시키기 전에 3일 동안 실온에서 교반하였다. TLC가 반응이 완료한 것으로 간주된 것을 나타낼 때, 반응 혼합물을 먼저 실온으로 그 다음 빙욕에서 0 - 5°C로 냉각시켰다. 고체는 여과로 수집하고 아세톤 (4 L)으로 세정하여 제1 산물의 원하는 조 생성물 (1516 g)을 얻었다. 여과물을 감압 하에서 농축하고 수득한 반고체는 아세톤 (1 L)으로 희석하였다. 이 고체는 그 다음 여과로 수집하여 제2 산물의 원하는 조 생성물 (221 g)을 얻었다. 조 생성물인 1-벤즈하이드릴아제티딘-3-올 하이드로클로라이드 (1737 g, 이론치 3998.7 g, 43.4% 수율)는 추가 정제없이 후속 반응에서 사용되기에 충분히 순수한 것으로 밝혀졌다. ¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.28 (br. d, 1H), 7.7 (m, 5H), 7.49 (m, 5H), 6.38 (d, 1H), 4.72 (br. s, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.85 (m, 2H) ppm; C₁₆H₁₈ClNO (MW 275.77; 유리 염기에 대해 C₁₆H₁₇NO, MW, 239.31), LCMS (EI) *m/e* 240 (M⁺ + H).

[0192] **tert-부틸 3-하이드록시아제티딘-1-카복실레이트 (17).** 수성 탄산나트륨 (Na₂CO₃, 5 L) 및 디클로로메탄 (CH₂Cl₂, 5 L)의 10% 용액 내 1-벤즈하이드릴아제티딘-3-올 하이드로클로라이드 (625 g, 2.27 mol)의 현탁액을 모든 고체가 용해될 때까지 실온에서 교반했다. 2개 층이 분리되고, 수성층은 디클로로메탄 (CH₂Cl₂, 2 L)으로 추출하였다. 조합된 유기 추출물을 황산나트륨 (Na₂SO₄) 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축하였다. 수득한 조 1-벤즈하이드릴아제티딘-3-올 유리 염기는 그 다음 THF (6 L)에 용해시키고 용액을 큰 파르 밤 (Parr bomb)에 넣었다. 디-tert-부틸 디카보네이트 (BOC₂O, 545 g, 2.5 mol, 1.1 당량) 및 탄소 (125 g, 50% 습식) 상 20% 팔라듐 (Pd)을 파르 밤에 첨가하였다. 용기에는 수소 가스 (H₂)로 30 psi까지 충전하고 실온에서 18시간 동안 안정한 수소 분위기 하에서 교반하였다 (용기는 3회 재충전하여 30 psi로 압력을 유지했다). HPLC가 반응이 완료되었다 (더 이상의 수소가 취해지지 않음)는 것을 나타낼 때, 반응 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고 셀라이트 패드는 THF (4 L)로 세정하였다. 여과물은 감압 하에서 농축하여 용매를 제거하고 잔사는 최소량의 디클로로메탄 (CH₂Cl₂)과 함께 Biotage 150 칼럼 상으로 장입하였다. 칼럼은 *n*-헵탄 내 20 - 50% 에틸 아세테이트로 용출하고, 순수한 원하는 생성물인, tert-부틸 3-하이드록시아제티딘-1-카복실레이트를 함유하는 분획을 수집하고 조합하였다. 용매를 감압 하에서 제거하여 tert-부틸 3-하이드록시아제티딘-1-카복실레이트 (357 g, 이론치 393.2 g, 90.8% 수율)를 무색 오일로서 얻어, 주위 온도에서 진공에서 정치하여 고화시켰다. ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.56 (m 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ppm.

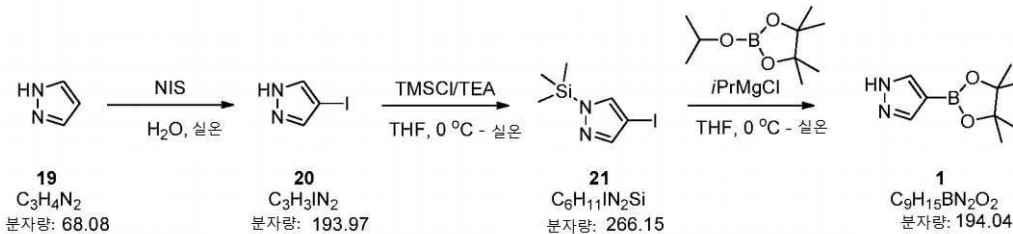
[0193] **tert-부틸 3-옥소아제티딘-1-카복실레이트 (18).** 에틸 아세테이트 (400 mL) 내 tert-부틸 3-하이드록시아제티딘-1-카복실레이트 (50 g, 289 mmol)의 용액을 0°C로 냉각시켰다. 그 다음 수득한 용액을 고체 TEMPO (0.5 g, 3.2 mmol, 0.011 당량) 및 물 (60 mL) 내 브롬화칼륨 (KBr, 3.9 g, 33.2 mmol, 0.115 당량)의 용액으로 0 - 5°C에서 처리하였다. 반응 온도를 0 - 5°C 사이로 유지하면서, 포화된 수성 중탄산나트륨 (NaHCO₃, 450 mL)의 용액 및 수성 나트륨 차아염소산염 용액 (NaClO, 10 - 13% 이용가능한 염소, 450 mL)을 첨가하였다. 일단 나트륨 차아염소산염의 용액을 첨가하면, 반응 혼합물의 색상은 즉시 변화되었다. 추가 양의 나트륨 차아염소산염 용액을 첨가할 때, 반응 혼합물의 색상은 서서히 바래진다. TLC가 모든 개시 물질이 소비되었다는 것을 나타낼 때, 반응 혼합물의 색상은 더 이상 변화되지 않았다. 그 다음 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (EtOAc, 500 mL)로 희

석하고 2개의 층을 분리하였다. 유기층은 물 (500 mL) 및 포화된 수성 염화나트륨 용액 (500 mL)으로 세정하고 황산나트륨 (Na₂SO₄) 상에서 건조하였다. 용매를 그 다음 감압 하에서 제거하여 조 생성물인, *tert*-부틸 3-옥소아제티딘-1-카복실레이트 (48 g, 이론치 49.47 g, 97% 수율)을 얻었으며, 이것은 충분히 순수한 것으로 밝혀져 추가 정제없이 후속 반응에서 직접적으로 사용하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.65 (s, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm.

[0194] ***tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카복실레이트 (2)**. 디에틸 시아노메틸 포스페이트 (745 g, 4.20 mol, 1.20 당량) 및 무수 테트라하이드로푸란 (THF, 9 L)을 써모웰, 투입 깔때기 및 질소 보호 튜브가 장착된 4-구 플라스크에 실온에서 첨가하였다. 용액을 얼음-메탄올 배스로 -14°C로 냉각시키고 무수 테트라하이드로푸란 (THF, 3.85 L, 3.85 mol, 1.1 당량) 내 칼륨 *tert*-부톡사이드 (*t*-BuOK)의 1.0 M 용액을 -5°C 아래로 반응 온도를 유지하면서 20분에 걸쳐서 첨가했다. 수득한 반응 혼합물을 -10°C에서 3시간 동안 교반하고 무수 테트라하이드로푸란 (THF, 2 L) 내 1-*tert*-부톡사카보닐-3-아제티딘 (600 g, 3.50 mol)의 용액을 -5°C 아래로 내부 온도를 유지하면서 2시간에 걸쳐서 첨가했다. 반응 혼합물을 -5 내지 -10°C에서 1시간에 걸쳐서 교반하고 그 다음 실온까지 느리게 가온하고 실온에서 밤새 교반했다. 그 다음 반응 혼합물을 물 (4.5 L) 및 포화된 수성 염화나트륨 용액 (NaCl, 4.5 L)으로 희석하고 에틸 아세테이트 (EtOAc, 2 x 9 L)로 추출하였다. 조합된 유기층은 염수 (6 L)로 세정하고 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄) 상에서 건조하였다. 용매는 감압 하에서 제거하고, 잔사는 실리카겔 (SiO₂, 1.5 Kg) 상에서 흡수하기 전에 디클로로메탄 (CH₂Cl₂, 4 L)으로 희석하였다. 실리카겔 상에서 흡수된 조 생성물은 플래시 칼럼 크로마토그래피 (SiO₂, 3.5 Kg, 0 - 25% EtOAc/헥산 구배 용출)로 정제하여 *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카복실레이트 (2, 414.7 g, 이론치 679.8 g, 61% 수율)를 백색 고체로서 얻었다. 2 경우: ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 5.40 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 4.61 (m, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm; C₁₀H₁₄N₂O₂ (MW, 194.23), LCMS (EI) *m/e* 217 (M⁺ + Na).

[0195] **실시예 5. 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸의 합성**

[0196] **반응식 V**



[0197] **4-아이오도피라졸 (20)**. 질소 유입구, 투입 깔때기, 써모웰, 및 기계적 교반기가 장착된 플라스크에 피라졸 (1, 450 g, 6.62 mol) 및 테트라하이드로푸란 (THF, 5 L)을 주위 온도에서 충전하였다. 그 다음 혼합물을 10°C로 냉각시키고 *N*-아이오도석신이미드 (NIS, 1490 g, 6.62 mol, 1.0 당량)를 대략 10°C에서 고체로 나누어서 혼합물에 첨가하였다. 수득한 반응 혼합물을 그 다음 주위 온도에서 1시간 동안 교반하였다 (주위 온도에 따라 더 긴 반응 시간이 필요할 수 있음). 그 다음 혼합물을 여과하고 THF를 감압 하에서 제거하였다. 잔사는 에틸 아세테이트 (6 L)에 현탁시키고 불용성 물질을 여과하였다. 어두운 여과물을 포화된 수성 티오황산나트륨 용액 (2 x 3 L) (유기층은 얼은 황색으로 밝아짐), 물 (2 x 3 L), 및 염수 (2 L)로 순차적으로 세정하였다. 수득한 유기층은 그 다음 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 그리고 감압 하에서 농축하여, 진공 오븐에서 대략 30°C에서 밤새 건조된 후 4-아이오도피라졸 (1138 g, 이론치 1284.1 g, 88.6%)을 백색 내지 얼은 황색 고체를 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.17 (bs, 1H), 7.93 (bs, 1H), 7.55 (bs, 1H) ppm; C₃H₃IN₂ (MW, 193.97), LCMS (EI) *m/e* 195 (M⁺ + H).

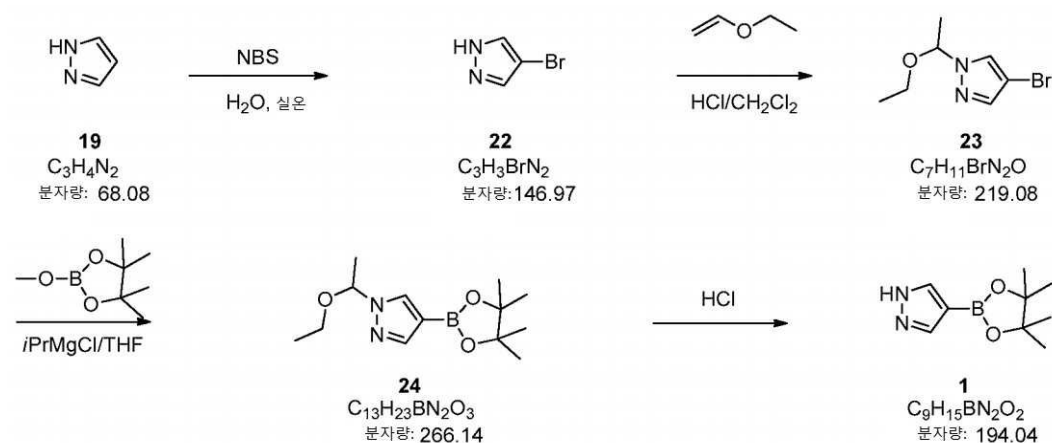
[0199] **1-트리메틸실릴-4-아이오도피라졸 (21)**. 환류 콘덴서, 질소 유입구, 기계적 교반기, 및 써모웰이 장착된 플라스크에 4-아이오도피라졸 (200 g, 1.03 mol) 및 THF (2 L)를 주위 온도에서 충전했다. 이 용액에 트리메틸아민 (TEA, 158 mL, 1.13 mol, 1.1 당량)을 첨가하고 수득한 용액을 얼음-염수 배스에서 0°C로 냉각시켰다. 이 용액에 온도가 18°C에 도달하도록 하는 격렬한 교반과 함께 클로로트리메틸실란 (TMS-Cl, 137 mL, 1.08 mol, 1.05

당량)을 첨가하였다. (반응물은 매우 두껍게 되어 교반하기가 어렵지만, 시간이 지난 후에 감당할 수 있게 된다). 발열 방법이 진정되었을 때, 냉수욕을 제거하고 반응물을 실온으로 가온시켰다. 반응에 이어 GC를 수행하고 약 1시간 후에 완료 간주되는 것으로 밝혀졌다 (반응의 샘플링은 공기 중에서 수행되고 TMS 가수분해를 방지하기 위해 건조 용매로 희석되어야 함). 그 다음 반응 혼합물을 질소 하에서 여과하기 전에 *n*-헵탄 (2 L)으로 희석하였다. 회전증발기에서 질소를 배출시키는 감압 하에서 여과물로부터 용매를 제거하였다. 잔류 오일을 *n*-헵탄 (1 L)으로 희석하고 재농축시켰다. *n*-헵탄을 첨가하여 고체가 형성된 경우, 2차 여과가 필요하였다. 잔사를 그 다음 Kugelrohr를 사용하여 감압 (약 0.5 Torr에서 70 - 90°C) 하에서 증류시켜 1-트리메틸실릴-4-아이오도피라졸 (263 g, 이론치 274.1 g, 96%)을 무색 오일로서 얻었다. TMS기가 빠르게 가수분해되기 때문에 이 물질은 항상 질소 하에 유지되어야 한다. 후속으로, 1-트리메틸실릴-4-아이오도피라졸은 1시간 동안 2 당량의 헥사메틸디실라잔으로 아이오도피라졸을 가열함에 의해 제조될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0200] **4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1)**. 기계적 교반기, 질소 유입구, 투입 깔때기 및 씨모웰이 장착된 플라스크에 1-트리메틸실릴-4-아이오도피라졸 (225.1 g, 0.85 mol) 및 THF (2200 mL)를 주위 온도에서 충전하였다. 이 혼합물을 얼음/염/염수 배스에서 대략 -6°C로 냉각시키고 THF 내 이소프로필 마그네슘 클로라이드의 용액 (THF 내 2 M 용액, 510 mL, 1.02 mol, 1.2 당량)을 내부 온도가 0°C를 초과하지 않는 속도로 첨가하였다. 금속/할로겐 교환의 정도는 GC로 모니터링하고 약 10분 후에 완료된 것으로 밝혀졌다. 오렌지 갈색 용액에 그 다음 먼저 온도를 0°C 아래로 유지하면서 느리게 그리고 그 다음 약 절반 정도의 화합물이 첨가된 후 온도가 5°C에 도달하도록 상당히 빠르게 2-이소프로폭시-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (이소프로필피나콜보레이트, 347 mL, 1.7 mol, 2.0 당량)을 첨가하였다 (반응물은 상당히 두껍게 되고 그 다음 서서히 얇아짐). 반응물을 그 다음 0°C에서 10분 동안 교반하고 나서 1시간에 걸쳐 주위 온도로 가온하고 추가의 1시간 동안 주위 온도에서 교반하였다. 반응 혼합물을 대략 6°C로 냉각시키고 포화된 수성 염화암모늄 용액 (NH₄Cl, 2.2 L)을 25°C로 온도를 증가시키면서 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 교반하고 나서 톨루엔 (10 L)으로 희석하였다. 층을 분리하고 (다량의 고체가 수성층에 존재함) 유기층을 물 (6 x 2.2 L) 및 염수 (2 x 2.2 L)로 순차적으로 세척하고 나서 황산나트륨 (Na₂SO₄) 상에서 건조시켰다. 건조 시약인, 황산나트륨 (Na₂SO₄)을 여과로 제거하고 용액을 감압 하에서 농축하였다. 잔류 톨루엔은 *n*-헵탄과 함께 동시-증발시켜 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1, 90.3 g, 이론치 164.9 g, 54.8%)을 백색 고체로서 얻었다. 1 경우: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.08 (bs, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 1.23 (s, 12H) ppm; C₉H₁₅BN₂O₂ (MW, 194.04), LCMS (EI) *m/e* 195 (M⁺ + H).

[0201] **실시예 6. 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸의 대안적인 합성**

[0202] **반응식 VI**



[0203] [0204] **4-브로모피라졸 (22)**. 피라졸 (19, 34.0 g, 0.5 mol) 및 NBS (89.0 g, 0.5 mol, 1.0 당량)를 주위 온도에서 물 (625 mL)에 현탁시켰다. 수득한 현탁액은 주위 온도에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물은 그 다음 EtOAc (2 x 100 mL)로 추출하였다. 조합된 EtOAc 추출물은 수성 Na₂S₂O₃ 및 염수로 세정하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축하여 조 4-브로모피라졸 (72.0 g, 이론치 73.5 g, 98% 수율)을 백색 고체로서 얻었으며 (GC 순도: >98%), 이것을 추가 정제없이 후속 반응에서 직접적으로 사용하였다.

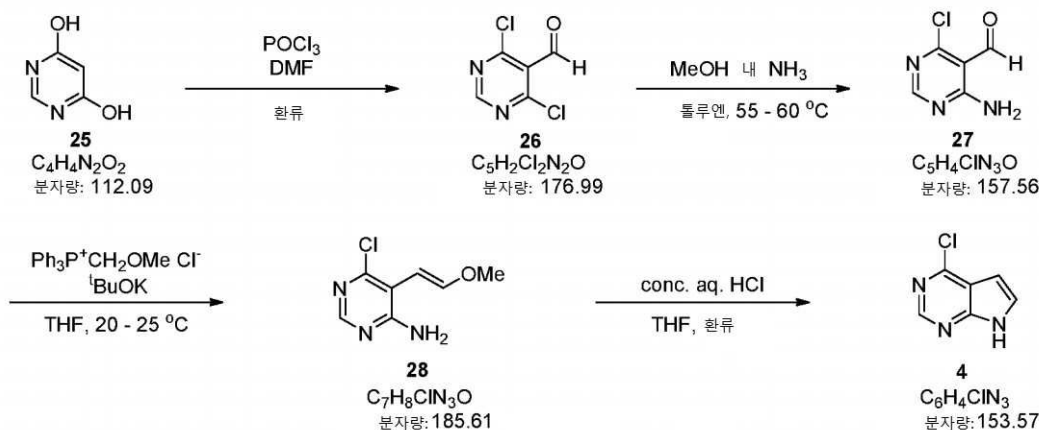
[0205] **4-브로모-1-(에톡시에틸)-1H-피라졸 (23)**. CH_2Cl_2 (600 mL) 내 4-브로모피라졸 (70.0 g, 0.476 mol)의 용액에 디옥산 (4 mL) 내 3.1 M HCl 및 에틸 비닐 에테르 (41 g, 0.569 mol, 1.2 당량)의 용액을 주위 온도에서 첨가하였다. 수득한 반응 혼합물을 주위 온도에서 3시간 동안 교반했다. 반응은 수성 NaHCO_3 으로 켄칭하고 2개의 층을 분리했다. 유기층을 물로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 감압 하에서 농축하여 건조하여 4-브로모-1-(에톡시에틸)-1H-피라졸 (113 g, 이론치 104.3 g, 97% 수율)을 오일로서 얻었으며 (GC 순도: 89%), 이것을 추가 정제없이 후속 반응에서 직접적으로 사용하였다.

[0206] **1-(에톡시에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸[1,3,2]디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (24)**. THF 내 $i\text{PrMgCl}\cdot\text{LiCl}$ (50 mmol, 1.8 당량)의 100 ml 용액에 4-브로모-1-(에톡시에틸)-1H-피라졸 (6.15 g, 28 mmol)을 주위 온도에서 첨가하였다. 수득한 반응 혼합물을 주위 온도에서 12시간 동안 교반하고 그 다음 -20°C 로 냉각시켰다. 메톡시 피나콜보레이트 (10.6 g, 67 mmol, 2.4 당량)를 그 다음 -20°C 에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 수득한 혼합물은 $0 - 10^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 교반하였다. 수성 NH_4Cl 을 첨가하여 반응을 켄칭하였다. 그 다음 혼합물을 석유 에테르 (PE)로 추출하였다. 조합된 PE 추출물을 포화된 NaHCO_3 으로 세정하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축하였다. 조 생성물을 PE에서 결정화시켜 1-(에톡시에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸[1,3,2]디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (24, 4.2 g, 이론치 7.45 g, 56.4% 수율)을 백색 내지 황백색 고체로 얻었다 (GC 순도: 99%). 24 경우: $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 8.09 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 5.55 (q, 1H, $J = 6.1$ Hz), 3.37 (dq, 1H, $J = 7.1, 9.6$ Hz), 3.12 (dq, 1H, $J = 7.0, 9.7$ Hz), 1.56 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz), 1.24 (s, 12H), 1.00 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz) ppm; $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{BN}_2\text{O}_3$ (MW, 266.14), LCMS (EI) m/e 267 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

[0207] **4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1)**. 1,2-디클로로에탄 (750 kg) 내 2,3-디메틸 부탄-2,3-디올 (25.0 kg, 211.6 mol) 및 1-(1-(에톡시에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (24, 55.0 kg, 206.7 mol)의 혼합물에 MTBE 내 HCl의 용액 (25.0 kg, 20 - 30%의 HCl)을 $0 - 5^\circ\text{C}$ 에서 느리게 첨가하였다. 수득한 반응 혼합물을 그 다음 3 - 5시간 동안 $10 - 20^\circ\text{C}$ 에서 교반하였다. HPLC로 모니터링할 때 선택적 탈보호 반응이 완료된 후 (1: 1% 미만), 반응 혼합물을 탈가스하고 질소로 재충전하고 나서 -15°C 로 냉각시켰다. 냉각된 반응 혼합물에 그 다음 트리에틸아민 (TEA, 30.0 kg, 296.5 mol)을 첨가하여 7 - 8로 pH를 조정하였다. 그 다음 혼합물을 물 (150 kg)로 처리하기 전에 주위 온도로 서서히 가온시켰다. 2개의 상을 분리하고 유기층은 염수 (60 kg)로 세정하고 황산나트륨 (Na_2SO_4) 상에서 건조시켰다. 건조 시약인, 황산나트륨 (Na_2SO_4)을 여과로 제거하고 수득한 용액을 감압 하에서 $40 - 50^\circ\text{C}$ 에서 점성 오일로 농축하였다. 잔사는 $60 - 70^\circ\text{C}$ 로 가온시키고 석유 에테르 (100 kg)로 동일한 온도에서 희석하였다. 수득한 혼합물을 그 다음 주위 온도 및 후속으로 -5°C 로 서서히 냉각시키고 동일한 온도에서 3시간 동안 교반하였다. 원심분리에 의해 고체를 수집하고 $50 - 60^\circ\text{C}$ 에서 진공 하에서 건조하여 원하는 조 생성물 (1, 33.75 kg, 이론치 40.11 kg, 84.1%)을 얻었다. 상기 원하는 조 생성물을 그 다음 1,2-디클로로에탄 (30 kg)에 현탁시키고 수득한 혼합물을 맑은 용액이 형성될 때까지 가열 환류하였다. 뜨거운 용액에 그 다음 석유 에테르 (150 kg)를 동일한 온도에서 첨가하였다. 수득한 혼합물을 그 다음 서서히 주위 온도 및 후속으로 -5°C 로 냉각시키고 동일한 온도에서 3시간 교반하였다. 원심분리에 의해 고체를 수집하고 진공 하에서 $50 - 60^\circ\text{C}$ 에서 건조시켜 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 (1, 31.0 kg, 이론치 40.11 kg, 77.3%)을 황백색 고체로 얻었으며, 이것은 실시예 5에서 상술된 바와 같이 합성 방법에 의해 합성된 물질에 대해 모든 비교할만한 양태에서 동일하다.

[0208] **실시예 7. 4-클로로-7H-[피롤로[2,3-d]피리미딘의 합성**

[0209] 반응식 VII



[0210]

[0211]

4,6-디클로로피리미딘-5-카브알데하이드 (26). 기계적 교반기, 투입 깔때기, 콘덴서, 열전쌍, 및 수성 NaOH 세정 용액 안으로 N₂ 스위치가 장착된 5 L 4-구 플라스크에, 인 옥시클로라이드 (POCl₃, 1 L, 10.572 mol, 4.82 당량)를 충전하고 얼음/염 배쓰에서 냉각시켰다. N,N-디메틸포름아미드 (DMF, 320 mL, 4.138 mol, 1.85 당량)를 그 다음 0 ± 2°C에서 플라스크에 적가하였다. 대략 0.5시간에 걸쳐 대략 100 mL의 DMF의 첨가 후, 결정화가 일어나고 반응 온도를 0°C에서 10°C로 증가시켰다. 첨가를 중단하고 혼합물을 대략 2°C로 다시 냉각되도록 하였다. 나머지 DMF는 8°C 아래에서 2.5시간에 걸쳐 첨가하였다. 현탁액이 매우 두꺼워져 교반이 어려워졌다. DMF의 첨가가 완료되면, 혼합물을 3 - 5°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. 4,6-디하이드록시피리미딘 (250 g, 2.232 mol)을 고체로서 나누어서 첨가하였다. 4,6-디하이드록시피리미딘의 약 1/3을 첨가한 후, 반응 혼합물은 보다 이동성이 있었고, 반응 온도가 0.5시간에 걸쳐 대략 12°C로 증가하면서 느린 발열 현상이 발생하였다. 나머지 4,6-디하이드록시피리미딘을 반응 온도가 12°C에서 27°C로 증가하면서 0.25시간에 걸쳐 나누어서 첨가하였다. 반응 온도를 간헐적 냉각으로 25 - 27°C로 유지하였고, 그 시간 동안 황색 현탁액이 얇아졌고 그 다음 다시 한번 두껍게 되었다. 약 1시간 동안 발열 현상이 진정된 후, 반응 혼합물을 천천히 가열하였다. 약 55°C에서 반응 혼합물이 매우 두껍게 되고 두 번째 온건한 발열 현상이 발생하였다. 반응 온도가 약 63°C로 계속 상승하는 동안 가열 맨틀을 제거하고 이 온도에서 몇 분 동안 유지하고 나서 적가하였다. 온화한 환류 (약 100°C)가 얻어질 때까지 혼합물의 가열을 재개하였다. 약 95°C에서 HCl 가스의 꾸준하고 상당히 신속한 방출이 시작되었고 반응 혼합물은 서서히 얇아지고 어두워졌다. 약 0.5시간 후, 환류 온도가 1.25시간에 걸쳐 115°C로 서서히 증가하면서 맑은 갈색 용액이 전개되었다. 환류에서 총 2.5시간 후, 반응 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 주위 온도에서 밤새 교반하였다. 과잉량의 POCl₃ (가능한 한 많이)을 감압 하에서 제거하였다 (배쓰 온도 45 - 50°C). 두꺼운 잔류 갈색 오일을 20 L 분별 깔때기 내의 차가운 H₂O (5 L) 안으로 매우 천천히 따르고, 수성 혼합물을 실온 근처에 유지하기 위해 필요한 만큼 얼음을 첨가하였다. 수성 혼합물을 EtOAc (2 x 3 L 이어서 1 x 2 L)로 추출하였다. 조합된 EtOAc 추출물을 H₂O (2 x 2.5 L), 포화된 NaHCO₃ 수용액 (1 L), 염수 (1 L)로 세정하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에서 농축하여 (35°C에서 배쓰 온도) 조 4,6-디클로로피리미딘-5-카브알데하이드 (270 g, 이론치 395 g, 68.4%)를 황색-오렌지 고체로서 얻었다. 이 조 물질의 20 g 부분을 Kugelrohr 증류 (90 - 100°C에서의 오픈 온도, 225 mTorr)에 의해 정제하여 15.3 g의 순수한 4,6-디클로로피리미딘-5-카브알데하이드를, 실온에서 정치시 황색으로 변하는, 백색 고체로서 수득하였다. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.46 (s, 1H), 8.89 (s, 1H) ppm.

[0212]

4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드 (27). MeOH 내 7 M NH₃의 용액 (265 mL, 1.855 mol, 2.0 당량)을 톨루엔 (3 L) 내 4,6-디클로로피리미딘-5-카브알데하이드 (163.7 g, 0.9301 mol)의 용액에 주위 온도에서 1.25시간에 걸쳐 첨가하였다. 반응 온도는 20°C에서 26°C로 느리게 증가하였고 황색 현탁액이 형성되었다. 온건한 냉각을 적용하여 반응 온도를 26°C 아래로 유지하였다. 현탁액을 주위 온도에서 3.5시간 동안 교반하고 나서 고체를 여과로 수집하였다. 고체를 EtOAc (1 L)로 세정하였다. 여과물을 감압 하에서 농축하고, 고체를 톨루엔 및 n-헵탄 (2:1 v/v, 600 mL)으로 분쇄하고, 여과 및 건조시켜 71.1 g의 4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드를 황색 고체로서 수득하였다. 반응 혼합물로부터 여과된 최초 고체는 추가 양의 4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드를 함유하였다. EtOAc (1.25 L)에서 1.5시간 동안 교반하고, 여과하고, 그런 다음 THF (750

mL)에서 1시간 동안 교반하고 다시 여과함에 의해 여과된 고체로부터 생성물을 추출하였다. EtOAc 및 THF 여과물 둘 모두를 감압 하에서 농축하고, 수득한 고체를 톨루엔 및 *n*-헵탄 (2:1 v/v, 450 mL)으로 분쇄하고, 여과하고 건조시켜 추가 44.1 g의 4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드를 황색 고체로서 수득하였다. 4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드의 조합된 수율 (115.2 g, 이론치 146.5 g)을 78.6%였다. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.23 (s, 1H), 8.71 (bs, 1H), 8.55 (bs, 1H), 8.39 (s, 1H) ppm; C₅H₄CIN₃O (MW, 157.56), LCMS (EI) *m/e* 158 (M⁺ + H).

[0213]

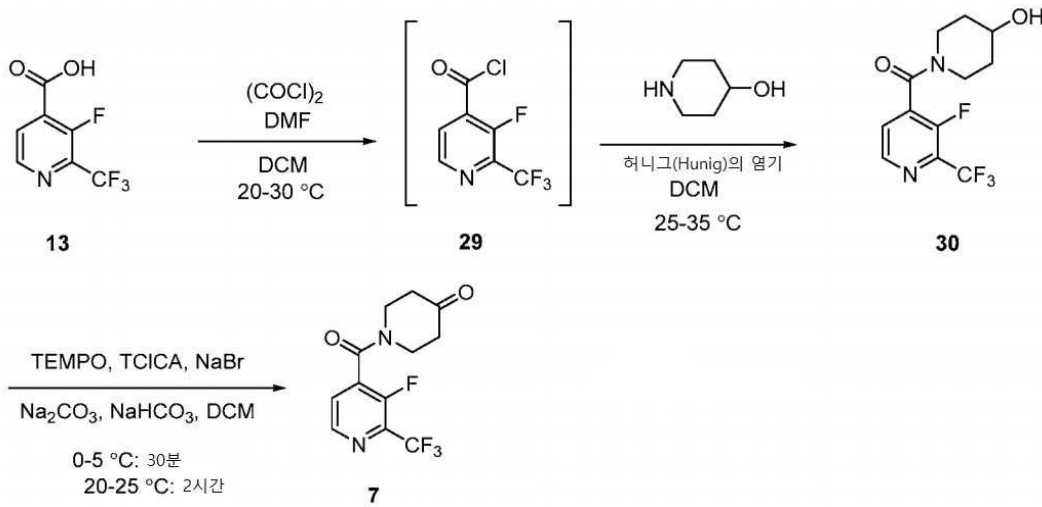
6-클로로-5-(2-메톡시비닐)피리미딘-4-일아민 (28). THF (1.5 L) 내 (메톡시메틸)트리페닐포스포늄 클로라이드 (276.0 g, 0.807 mol, 1.1 당량)의 현탁액을 -2°C로 얼음/염 배스에서 냉각시키고 THF 내 1 M 칼륨 *tert*-부톡사이드 (KO^tBu) (807 mL, 0.807 mol, 1.1 당량)를 -2 내지 -3°C에서 1.5시간에 걸쳐 첨가하였다. 심홍색-오렌지 혼합물을 -2 내지 -3°C에서 1시간 동안 교반하였다. 4-아미노-6-클로로피리미딘-5-카브알데하이드 (115.2 g, 0.7338 mol, 1.0 당량)를 그 다음 고체 형태로 반응 혼합물에 나누어서 첨가하고 용기 및 깔때기를 세정하기 위해 THF (200 mL)를 사용하였다. 첨가 동안 반응 온도는 -3°C에서 13°C로 증가하였고 갈색 색상이 전개되었다. 반응 온도가 10°C로 떨어질 때, 냉각 배스를 제거하고 반응 혼합물을 주위 온도로 가온하고 주위 온도에서 42시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화된 NH₄Cl 수용액 (750 mL)의 느린 첨가로 켄칭하기 전에 -2°C로 냉각시켰다. 혼합물을 감압 하에서 농축하여 대부분의 THF를 제거하였다. 잔사를 EtOAc (3 L)와 H₂O (1 L) 사이에서 분할시켰다. 유기상을 여과하여 계면에서 불용성 물질을 제거하고, 그 다음 2 N HCl (4 x 250 mL)과 이어서 3 N HCl (2 x 250 mL)로 추출하였다. 조합된 HCl 추출물을 EtOAc (500 mL)로 다시 추출하고 그 다음 셀라이트를 통해 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 여과물을 얼음/염수 배스에서 냉각시키고 6N 수성 NaOH 용액으로 pH 8로 조정하고 EtOAc (3 x 1 L)로 추출하였다. 조합된 EtOAc 추출물을 염수 (1 L)로 세정하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 목탄 (10 g) 및 실리카겔 (10 g)과 함께 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 셀라이트 패드를 EtOAc (1 L)로 세정하였다. 여과물을 농축하고, 잔류 EtOAc를 *n*-헵탄 (500 mL)과 함께 공-증발시켰다. 수득한 황갈색 고체를 고진공 하에서 2시간 동안 펌핑하여 조 6-클로로-5-(2-메톡시비닐)피리미딘-4-일아민 (72.3 g, 이론치 136.2 g, 53.1%)을 얻었다. 원하는 조 생성물을 추가 정제없이 다음 반응에 사용하였다. 조 생성물의 샘플 (2.3 g)을 0 - 35% EtOAc/*n*-헵탄으로 용리시키면서, 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 1.7 g의 순수한 6-클로로-5-(2-메톡시비닐)피리미딘-4-일아민을 백색 고체로서 얻었으며, 이것은 *E/Z* 이성질체의 1 내지 2 혼합물인 것으로 밝혀졌다. *E*-이성질체에 대한 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.02 (s, 1H), 7.08 (bs, 2H), 6.92 (d, 1H, *J* = 13.1), 5.35 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 3.68 (s, 3H) ppm 및 *Z*-이성질체 경우: δ 8.06 (s, 1H), 7.08 (bs, 2H), 6.37 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 5.02 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 3.69 (s, 3H) ppm; C₇H₆CIN₃O (MW, 185.61), LCMS (EI) *m/e* 186/188 (M⁺ + H).

[0214]

4-클로로-7H-[피롤로[2,3-*d*]피리미딘 (4). 농축된 HCl (5 mL)을 THF (700 mL) 내 조 6-클로로-5-(2-메톡시비닐)피리미딘-4-일아민 (70.0 g, 0.3784 mol)의 용액에 첨가하고 수득한 반응 혼합물을 7.5시간 동안 가열 환류하였다. 가온시 서서히 채용해되는 밝은 현탁액이 형성되었다. HPLC로 모니터링된 바와 같이 반응이 완료된 것으로 간주될 때, 반응 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 주위 온도에서 밤새 교반하였다. 고체 NaHCO₃ (15 g)을 반응 혼합물에 첨가하고 수득한 혼합물을 주위 온도에서 1시간 동안 교반하였다. 목탄 (7 g), 실리카겔 (7 g) 및 Na₂SO₄ (20 g)를 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 40°C로 가열하였다. 그 다음 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 셀라이트 패드를 THF (1 L)로 세정하면서 셀라이트를 통해 여과하였다. 여과물을 감압 하에 농축시키고, 수득한 고체를 감압 하에서 건조시켜 조 4-클로로-7H-[피롤로[2,3-*d*]피리미딘 (4, 58.1 g, 이론치 58.1 g, 100%)을 황색-갈색 고체로 얻었다. 이 원하는 조 생성물을 50 - 55°C에서 EtOAc (1 L)에 용해시키고 활성탄 (3 g)으로 처리하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 가온하면서 여과하고 셀라이트 패드는 따뜻한 EtOAc (250 mL)로 세정하였다. 여과물을 약 500 mL로 농축시키고 현탁액을 주위 온도에서 밤새 정치시켰다. 현탁액을 후속으로 0 - 5°C로 2시간 동안 냉각시키고 나서 고체를 여과로 수집하였다. 고체를 건조시켜 순수한 4-클로로-7H-[피롤로[2,3-*d*]피리미딘 (4, 54.5 g, 이론치 58.1 g, 94%)을 황색-갈색 결정으로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.58 (bs, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz) ppm; LCMS (EI) *m/e* 154/156 (M⁺ + H).

[0215] 실시예 8. 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7)의 대안적인 합성

[0216] 반응식 VIII



[0217]

[0218] 단계 1: (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(4-하이드록시피페리딘-1-일)메탄온 (30). 디클로로메탄 (270 mL) 내 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코틴산 (13) (54.01 g, 258.3 mmol)의 용액에 *N,N*-디메틸포름아미드 (0.34g, 4.65 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 이 용액에 디클로로메탄 (81 ml) 내 옥살릴 클로라이드 (34.41 g, 271.2 mmol)를 투입 깔때기를 통해 30분에 걸쳐 내부 온도를 15 내지 25°C로 유지하면서 첨가하였다. 투입 깔때기를 디클로로메탄 (27 mL)으로 린스하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하여 갈색 용액을 수득하였다. 디클로로메탄을 감압 하에서 30°C의 온도에서 증류시켰다. 잔사를 디클로로메탄 (270 mL)에 용해시키고 용매를 30°C에서 감압 하에서 증류 제거하였다. 수득한 잔사를 디클로로메탄 (270 mL)에 용해시켜 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일 클로라이드 (29)의 디클로로메탄 용액을 얻었다. 또 다른 플라스크에 4-하이드록시피페리딘 (33.18 g, 328 mmol), 디클로로메탄 (270 mL), 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (108 mL, 619.9 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 33°C로 가열하여 용액을 형성하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 용액에 디클로로메탄 내 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일 클로라이드 (29)를 25 내지 35°C의 온도에서 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 25 내지 35°C에서 추가로 1시간 동안 교반하였다. 용기에 물 (430 mL) 및 37% 염산 (62.4 g (633 mmol))을 첨가하였다. 희석된 염산을 25°C 아래의 내부 온도에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반한 후, 유기상을 분리에 의해 수집하였다. 유기상을 9.5% 염수 (210 g)로 세정하였다. 수성상을 조합하고 디클로로메탄 (430 mL)으로 추출하였다. 유기상을 조합하고 4.5% 염수 (210 ml) 및 물 (215 mL)로 세정하였다. 디클로로메탄을 2-메톡시-2-메틸프로판 (TBME)으로 용매 교환에 의해 제거하였다. TBME (135 mL) 내 잔사를 1시간 동안 60°C로 가열하였다. 혼합물을 서서히 0°C로 냉각시켜 (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(4-하이드록시피페리딘-1-일)메탄온으로 결정화하였다. 혼합물을 여과하고 습식 케이크를 TBME (27 mL)로 세정하였다. 고체를 50°C에서 건조시켜 (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(4-하이드록시피페리딘-1-일)메탄온 (30)을 얻었다. 밝은 갈색 고체로 (69.95 g, 92%). HPLC-MS: 293.0 (M+H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.09 - 3.99 (m, 4H); 1.37 - 1.80 (m, 4H); 3.75 (m, 1H); 4.84 (d, 1H (b)); 8.65 (d, 1H, J = 4.7Hz); 7.89 (dd, 1H, J = 4,7, J = 4.7 Hz). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 33,5, 34,3, 38.9, 44.0, 65.0, 120.6, 127.6, 134.5, 134.7, 146.2, 152.2; 160.2. C₁₂H₁₂F₄N₂O₂ (MW 292.23), LCMS (EI) *m/e* 293.0 (M⁺ + H). 이 방법을 통한 화합물 30의 순도는 HPLC에 의해 측정된 바와 같이 약 98%보다 큰 것으로 결정되었다.

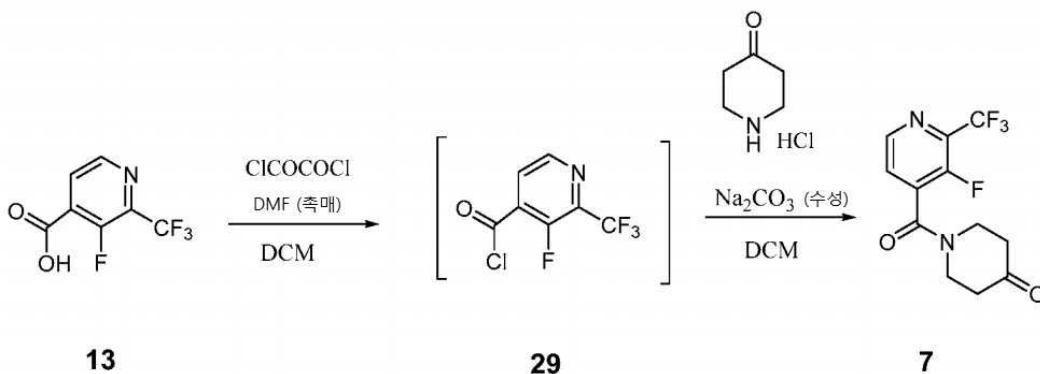
[0219] 단계 2: 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7). 플라스크에 (3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일)(4-하이드록시피페리딘-1-일)메탄온 (30) (50 g, 171.1 mmol), 디클로로메탄 (733 mL), 물 (766 mL), 중탄산나트륨 (71.4 g, 849.7), 탄산나트륨 99.1 g, 85.2 mmol), 나트륨 브로마이드 (1.76 g, 17.1 mmol), 및 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘일옥시 (TEMPO) (0.535 g, 3.42 mmol)를 15 내지 25°C에서 첨가하였다. 혼합물을 0 내지 5°C로 냉각시켰다. 상기 혼합물에 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-4,4,6-트리온 (23.8 g, 102 mmol)을 10분에 걸쳐 4개 부분으로 첨가하였다. 혼합물을 0 내지 5°C에서 30분 동안 교반하고

그 다음 혼합물을 30분 내에 20 내지 25℃로 가온시켰다. 혼합물을 20 내지 25℃에서 추가로 1시간 동안 교반한 후, 20 내지 25℃에서 메탄올 (26.23 mL, 647.5 mmol)의 첨가로 반응을 쉐칭하였다. 혼합물을 20분 동안 교반하고 셀라이트 베드 상에서 여과하였다. 셀라이트 (20 g) 베드는 디클로로메탄 (50 mL)으로 세정하였다. 유기상을 분리하였다. 유기상을 6% 염수 (266 g) 및 물 (250 mL)로 순차적으로 세정하였다. 활성탄 (3.5 g)을 유기상에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반한 후, 이를 셀라이트 (20g) 베드 상에서 여과하였다. 필터 베드를 디클로로메탄 (50 mL)으로 세정하였다. 디클로로메탄을 2-메톡시-2-메틸프로판 (TBME)으로 용매 교환에 의해 제거하고 TBME (180 mL) 내 잔사를 50 내지 60℃로 가열하였다. 헵탄 (500 mL)을 따뜻한 혼합물 (500 mL)에 서서히 첨가하면서 생성물을 결정화시키기 위해 내부 온도를 50℃ 이상으로 유지하였다. 혼합물을 서서히 10℃로 냉각시키고 여과하였다. 습식 케이크는 헵탄 (2 x 75 mL)으로 세정하였다. 고체는 감압 하에서 건조시켜 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7) (49.7 g, 87.9% 수율)을 황백색 내지 갈색 고체로 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.68 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.69$ Hz, 1H, 피리딘 내 NCH), 7.97 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4.69$ Hz, $^4J_{\text{HF}} = 4.69$ Hz, 1H, 피리딘 내 NCCH), 3.92 (br s, 2H, 피페리딘 라인 내 NCH_2 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH_2 중 하나, 축 위치에서 둘 모두), 3.54 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.15$ Hz, 2H, 피페리딘 라인 내 NCH_2 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH_2 중 하나, 적도방향 위치에서 둘 모두), 2.48 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.44$ Hz, 2H, NCCH_2), 2.34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.15$ Hz, 2H, NCCH_2) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, $^1J_{\text{CF}} = 266.89$ Hz, C-F), 146.90 (d, $^4J_{\text{CF}} = 6.05$ Hz, 피리딘 내 NCH), 135.56 (C-C=O), 134.78 -135.56 (m, NCCF_3), 128.27 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.19$ Hz, 피리딘 내 NCCH), 119.52 (dX 사중항, $^1J_{\text{CF}} = 274.38$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 4.89$ Hz, CF_3), 45.10 (피페리딘 고리 내 NC) ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 와 중첩에 기인한 하나의 탄소 (피페리딘 고리 내 NCC) 누락; $^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -64.58 (d, $^4J_{\text{FF}} = 15.85$ Hz, F_3C), -128.90 (d X 사중항, $^4J_{\text{FF}} = 15.85$ Hz, $^4J_{\text{FH}} = 4.05$ Hz, FC) ppm; $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (MW, 290.21), LCMS (EI) m/e 291.1 ($\text{M}^+ + \text{H}$). 이 방법을 통한 화합물 7의 순도는 HPLC에 의해 측정된 바와 같이 약 90%와 약 96% 사이인 것으로 결정되었다.

[0220] 산화제 (예를 들어, TEMPO)의 증가된 사용은 증가된 불순물 형성과 줄어든 단리 수율을 초래할 수 있다는 것에 주목한다. 더 긴 산화 시간은 또한 증가된 불순물 형성과 줄어든 단리 수율을 유발할 수 있다.

[0221] 실시예 9. 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7)의 대안적인 합성

[0222] 반응식 IX



[0223]

[0224] 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7). 디클로로메탄 (150 mL) 내 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코틴산 (13) (20 g, 96.65 mmol)의 용액에 *N,N*-디메틸포름아미드 (0.13g, 1.72 mmol)를 실온에서 첨가했다. 이 용액에 디클로로메탄 (40 ml) 내 옥살릴 클로라이드 (12.75 g, 100.4 mmol)를 투입 깔때기를 통해 30분에 걸쳐 내부 온도를 15 내지 25℃로 유지하면서 첨가하였다. 투입 깔때기를 디클로로메탄 (10 mL)으로 린스하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하여 중간체 3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일 클로라이드의 갈색 용액을 수득하였다. 용액에 4-피페리돈 일

수화물 하이드로클로라이드 (19.1 g, 124.3 mmol)를 충전하였다. 혼합물을 0 내지 5°C로 냉각시키고 물 (200 mL) 내 탄산나트륨 (20.28 g, 191.3 mmol)의 수용액을 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물은 실온으로 가온시키고 2시간 동안 교반하였다. 유기상을 분리하고 6% 염수 (110 g) 및 물 (100 mL)로 순차적으로 세정하였다. 유기상에 활성탄 (1.4 g)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 60분 동안 교반한 후, 혼합물을 셀라이트 (5 g) 베드 상에서 여과하였다. 필터 베드를 디클로로메탄 (40 mL)으로 세정하였다. 디클로로메탄을 2-메톡시-2-메틸프로판 (TBME)으로 용매 교환에 의해 제거하고 TBME (100 mL) 내 잔사를 50 내지 60°C로 가열하였다. 헵탄 (250 mL)을 따뜻한 혼합물에 서서히 첨가하면서 생성물을 결정화시키기 위해 내부 온도를 50°C 이상으로 유지하였다. 혼합물을 서서히 10°C로 냉각시키고 여과하였다. 습식 케이크는 헵탄 (2 x 40 mL)으로 세정하였다. 고체는 감압 하에서 건조시켜 1-(3-플루오로-2-(트리플루오로메틸)이소니코티노일)피페리딘-4-온 (7) (25.8 g, 92.7% 수율)을 황백색 내지 갈색 고체로 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.68 (d, ³J_{HH} = 4.69 Hz, 1H, 피리딘 내 NCH), 7.97 (dd, ³J_{HH} = 4.69 Hz, ⁴J_{HF} = 4.69 Hz, 1H, 피리딘 내 NCCH), 3.92 (br s, 2H, 피페리딘 라인 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 축 위치에서 둘 모두), 3.54 (t, ³J_{HH} = 6.15 Hz, 2H, 피페리딘 라인 내 NCH₂ 중 하나, 피페리딘 고리 내 또 다른 NCH₂ 중 하나, 적도방향 위치에서 둘 모두), 2.48 (t, ³J_{HH} = 6.44 Hz, 2H, NCCH₂), 2.34 (t, ³J_{HH} = 6.15 Hz, 2H, NCCH₂) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, ¹J_{CF} = 266.89 Hz, C-F), 146.90 (d, ⁴J_{CF} = 6.05 Hz, 피리딘 내 NCH), 135.56 (C-C=O), 134.78 -135.56 (m, NCCF₃), 128.27 (d, ³J_{CF} = 7.19 Hz, 피리딘 내 NCCH), 119.52 (dX 사중항, ¹J_{CF} = 274.38 Hz, ³J_{CF} = 4.89 Hz, CF₃), 45.10 (피페리딘 고리 내 NC) ppm, (CD₃)₂SO와 중첩에 기인한 하나의 탄소 (피페리딘 고리 내 NCC) 누락; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.58 (d, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, F₃C), -128.90 (d X 사중항, ⁴J_{FF} = 15.85 Hz, ⁴J_{FH} = 4.05 Hz, FC) ppm; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (MW, 290.21), LCMS (EI) *m/e* 291.1 (M⁺ + H). 이 방법을 통한 화합물 7의 순도는 HPLC에 의해 측정된 바와 같이 약 99%보다 큰 것으로 결정되었다.

[0225] **실시예 A: 시험관내 JAK 키나제 검정**

[0226] 화학식 I의 화합물을 Park *et al.*, *Analytical Biochemistry* **1999**, *269*, 94-104에 기재된 하기 시험관내 검정에 따른 JAK 표적의 억제 활성에 대해 시험하였다. N-말단 His 태그를 갖는 인간 JAK1 (a.a. 837-1142) 및 JAK2 (a.a. 828-1132)의 촉매 도메인을 곤충 세포에서 배클로바이러스를 사용하여 발현시키고 정제하였다. JAK1 및 JAK2의 촉매 활성은 바이오티닐화된 펩타이드의 인산화를 측정함에 의해 분석하였다. 인산화된 펩타이드는 균질한 시간 분해 형광 (HTRF; homogenous time resolved fluorescence)에 의해 검출하였다. 화합물의 IC₅₀들은 효소, 100 mM NaCl을 갖는 50 mM Tris (pH 7.8) 완충액 내 ATP 및 500 nM 펩타이드, 5 mM DTT, 및 0.1 mg/mL (0.01%) BSA를 함유하는 40 마이크로 L 반응에서 각각의 키나제에 대해 측정하였다. 1 mM IC₅₀ 측정의 경우, 반응에서 ATP 농도는 1 mM이었다. 반응은 실온에서 1시간 동안 수행하였고 그 다음 검정 완충액 (Perkin Elmer, 매사추세츠주 보스턴 소재) 내 20 uL 45 mM EDTA, 300 nM SA-APC, 6 nM Eu-Py20으로 중단시켰다. 유로퓸 표지된 항체에 대한 결합은 40분 동안 이루어졌고 HTRF 신호는 용합 플레이트 리더 (Perkin Elmer, 매사추세츠주 보스턴 소재) 상에서 측정하였다. 화학식 I의 화합물 및 아디프산 염은 (1 mM ATP에서 측정된) > 10의 JAK2/JAK1 비로 (1 mM ATP에서 측정된) ≤ 5 nM의 JAK1에서 IC₅₀을 가졌다.

[0227] **실시예 B: 세포 검정**

[0228] 성장에 대해 사이토카인에 의존적이고 따라서, JAK/STAT 신호 형질도입에 의존적인 암 세포주가 RPMI 1640, 10% FBS, 및 1 nG/mL의 적절한 사이토카인 내 6000 세포/웰 (96 웰 플레이트 형식)에 도말될 수 있다. 화합물은 DMSO/배지 내 세포에 첨가될 수 있고 (최종 농도 0.2% DMSO) 72시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션될 수 있다. 세포 생존력에 대한 화합물의 효과는 CellTiter-Glo 발광성 세포 생존력 검정 (Promega)과 이어서 TopCount (Perkin Elmer, 매사추세츠주 보스턴 소재) 정량화를 사용하여 평가된다. 화합물의 잠재적인 부정확한 효과는 동일한 검정 판독을 갖는 비-JAK 유도된 세포주를 사용하여 병렬적으로 측정된다. 모든 실험은 전형적으로 반복하여 수행된다.

- [0229] 상기 세포주는 또한 JAK 키나제 또는 잠재적인 다운스트림 기질 예컨대 STAT 단백질, Akt, Shp2, 또는 Erk의 인산화에 대한 화합물의 효과를 조사하는데 사용될 수 있다. 이들 실험은 밤새 사이토카인 기아와, 이어서 화합물로 간단한 사전인큐베이션 (2시간 또는 그 미만) 및 대략 1시간 또는 그 미만의 사이토카인 자극 후에 수행될 수 있다. 단백질을 그 다음 세포로부터 추출하고, 인산화된 단백질과 총 단백질을 구별할 수 있는 항체를 사용하여 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA를 포함하여 당해 분야에서 교시된 것에 친숙한 기술에 의해 분석한다. 이들 실험은 정상 또는 암 세포를 이용하여 종양 세포 생존 생물학 또는 염증성 질환의 매개체에서 화합물의 활성을 조사할 수 있다. 예를 들어, 후자와 관련하여, 사이토카인 예컨대 IL-6, IL-12, IL-23, 또는 IFN은 JAK 활성화를 자극하기 위해 사용될 수 있어 STAT 단백질(들)의 인산화 및 잠재적으로 전사 프로파일 (어레이 또는 qPCR 기술에 의해 평가됨) 또는 단백질, 예컨대 IL-17의 생산 및/또는 분비를 초래한다. 이들 사이토카인 매개된 효과를 억제하는 화합물의 능력은 당해 분야에서 교시된 것에 일반적인 기술을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0230] 본 명세서에서의 화합물은 또한 돌연변이체 JAK, 예를 들어, 골수성 증식성 장애에서 발견된 JAK2V617F 돌연변이에 대한 그것의 효력 및 활성을 평가하도록 설계된 세포 모델에서 시험될 수 있다. 이들 실험은 종종 야생형 또는 돌연변이체 JAK 키나제가 이소성으로 발현되는 혈액학적 계열 (예를 들어 BaF/3)의 사이토카인 의존적 세포를 이용한다 (James, C., *et al. Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., *et al. JBC* 280:41893-41899). 중점은 세포 생존, 증식, 및 인산화된 JAK, STAT, Akt, 또는 Erk 단백질에 대한 화합물의 효과를 포함한다.
- [0231] 본 명세서에서의 특정 화합물은 T-세포 증식을 억제하는 그것의 활성에 대해 평가될 수 있다. 예컨대 검정은 제 2 사이토카인 (즉 JAK) 유도된 증식 검정 및 또한 면역 억제 또는 면역 활성화의 억제의 단순한 검정으로 간주될 수 있다. 하기는 이러한 실험을 수행할 수 있는 방법에 대한 간략한 개요이다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 Ficoll Hypaque 분리 방법을 사용하여 인간 전혈 샘플로부터 제조되고, T-세포 (분획 2000)는 정화에 의해 PBMC로부터 수득될 수 있다. 새롭게 단리된 인간 T-세포는 배양 배지 (10% 우태 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640)에서 37°C에서 2×10^6 세포/ml의 밀도로 최대 2일 동안 유지될 수 있다. IL-2 자극된 세포 증식 분석을 위해, T-세포를 먼저 72시간 동안 10 ug/mL의 최종 농도에서 식물성혈구응집소 (PHA)로 처리한다. PBS로 1회 세정한 후, 6000 세포/웰을 96-웰 플레이트에 도말하고 100 U/mL 인간 IL-2 (ProSpec-Tany TechnoGene; 이스라엘 레호보트 소재)의 존재에서 배양 배지에서 상이한 농도의 화합물로 처리한다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하고 증식 지수는 공장 제안 프로토콜 (Promega; 위스콘신주 메디슨 소재)에 따라 CellTiter-Glo 발광성 시약을 사용하여 평가하였다.
- [0232] **실시예 C: 생체내 항종양 효능**
- [0233] 본 명세서에서의 화합물은 면역 손상된 마우스에서의 인간 종양 이종이식 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들어, INA-6 형질세포종 세포주의 종양형성 변이체는 피하로 SCID 마우스를 접종하기 위해 사용될 수 있다 (Burger, R., *et al. Hematol J.* 2:42-53, 2001). 종양 담지 동물은 그 다음 약물 또는 비히클 처리 그룹으로 무작위화할 수 있고, 상이한 용량의 화합물을 이식가능한 펌프를 사용하여 경구, i.p., 또는 연속적 주입을 포함하는 다수의 통상적인 경로에 의해 투여할 수 있다. 캘리퍼를 사용하여 경시적으로 종양 성장을 추적하였다. 또한, JAK 활성 및 다운스트림 신호전달 경로에 대한 화합물 효과를 평가하기 위해 상기 (실시예 B) 기재된 바와 같이 분석을 위해 치료의 개시 후 임의의 시간에 종양 샘플을 수확할 수 있다. 또한, 화합물(들)의 선택성은 K562 종양 모델과 같은 다른 공지된 키나제 (예를 들어 Bcr-Abl)에 의해 유도되는 이종이식 종양 모델을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0234] **실시예 D: 쥐과 피부 접촉 지연된 과민증 반응 테스트**
- [0235] 본 명세서에서의 화합물은 또한 T-세포 유도된 쥐과 지연된 과민증 테스트 모델에서 (JAK 표적을 억제하는) 그것의 효능에 대해 시험될 수 있다. 쥐과 피부 접촉 지연된-유형 과민증 (DTH) 반응은 임상 접촉 피부염 및 건선과 같은 피부의 다른 T-림프구 매개된 면역 장애의 유효한 모델인 것으로 간주된다 (*Immunol Today*. 1998 Jan;19(1):37-44). 쥐과 DTH는 면역 침윤물, 염증성 사이토카인에서 동반 증가, 및 각질형성세포 과증식을 포함하여, 건선과 다수의 특성을 공유한다. 또한, 병상에서 건선을 치료하는데 효과적인 많은 부류의 제제는 또한 마우스에서 DTH 반응의 효과적인 억제제이다 (Agents Actions. 1993 Jan;38(1-2):116-21).
- [0236] 0 및 1일차에, Balb/c 마우스는 국소 적용으로, 항원 2,4,디니트로-플루오로벤젠 (DNFB)으로 그것의 면도된 복부에 감각된다. 5일차에, 엔지니어의 마이크로미터를 사용하여 귀의 두께를 측정한다. 이 측정을 기록하고 기준선으로 사용한다. 그 다음 두 동물의 귀 둘 모두에 0.2%의 농도에서 총 20 μ L (내부 귀바퀴 상에 10 μ L 및 외부 귀바퀴 상에 10 μ L)에서의 DNFB의 국소 적용에 의해 공격한다. 공격 24시간 내지 72시간 후에, 귀를 다시

측정한다. 테스트 화합물의 치료는 감각 및 공격 국면 (-1일차 내지 7일차) 전반에 걸쳐 또는 공격 국면 이전 및 전반에 걸쳐 (일반적으로 4일차 내지 7일차의 오후) 제공된다. 테스트 화합물의 치료 (다른 농도로)는 전신적으로 또는 국소적으로 (귀에 대한 치료의 국소 적용) 투여된다. 테스트 화합물의 효능은 치료 없는 상황에 비교해 귀 부종에서의 감소에 의해 나타낸다. 20% 이상의 감소를 야기하는 화합물은 효과적인 것으로 간주되었다. 일부 실험에서, 마우스는 공격되었지만 감각되지 않았다 (음성 대조군).

[0237] 테스트 화합물의 억제성 효과 (JAK-STAT 경로의 활성화 억제)는 면역조직화학 분석에 의해 확인될 수 있다. JAK-STAT 경로(들)의 활성화는 기능적 전사 인자의 형성 및 전좌를 초래한다. 또한, 면역 세포의 유입 및 각질 형성세포의 증가된 증식은 또한 조사되고 정량화될 수 있는 귀에서의 고유의 발현 프로파일 변화를 제공해야 한다. 포르말린 고정되고 파라핀 포매된 귀 섹션 (DTH 모델에서 공격 국면 후에 수확됨)은 인산화된 STAT3 (클론 58E12, 세포 신호전달 기술)과 특이적으로 상호작용하는 항체를 사용하여 면역조직화학 분석을 거친다. 마우스 귀는 비교를 위해 DTH 모델에서 테스트 화합물, 비히클 또는 텍사메타손 (건선에 대한 임상적으로 효과적인 치료)으로 처리되거나 임의의 치료 없이 처리된다. 테스트 화합물 및 텍사메타손은 정성적 및 정량적으로 유사한 전사 변화를 생성할 수 있고, 테스트 화합물 및 텍사메타손 둘 모두는 침윤하는 세포의 수를 감소시킬 수 있다. 테스트 화합물의 전신 및 국소 투여 둘 모두는 억제성 효과, 즉 침윤하는 세포의 수에서의 감소 및 전사 변화의 억제를 생성할 수 있다.

[0238] **실시예 E: 생체내 항-염증성 활성화**

[0239] 본 명세서에서의 화합물은 단일 또는 복합 염증 반응을 복제하도록 설계된 설치류 또는 비-설치류 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 관절염의 설치류 모델을 사용하여 예방적으로 또는 치료적으로 투여되는 화합물의 치료 가능성을 평가할 수 있다. 이들 모델은 마우스 또는 랫트 콜라겐-유도된 관절염, 랫트 아췌반트-유도된 관절염, 및 콜라겐 항체-유도된 관절염을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 비제한적으로, 다발성 경화증, 유형 I-진성 당뇨병, 포도막염, 갑상샘염, 중증 근무력증, 면역글로불린 신병증, 심근염, 기도 민감화 (천식), 낭창, 또는 결장염을 포함한 자가면역 질환이 또한 본 명세서에서의 화합물의 치료 가능성을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 이들 모델은 연구 공동체에서 잘 확립되어 있으며 당해 분야에서 교시된 것에 친숙하다 (Current Protocols in Immunology, Vol 3., Coligan, J.E. et al, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. and Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

[0240] **실시예 F: 안구 건조, 포도막염, 및 결막염의 치료를 위한 동물 모델**

[0241] 제제는, 비제한적으로, 토끼 콘카나발린 A (ConA) 눈물샘 모델, 스코폴라민 마우스 모델 (피하 또는 경피), 보툴리눔 마우스 눈물샘 모델, 또는 안구샘 기능이상을 초래하는 임의의 수의 자발적인 설치류 자가면역 모델 (예를 들어 NOD-SCID, MRL/lpr, 또는 NZB/NZW)을 포함하여 당해 분야에서 교시된 것에 알려진 안구 건조 중 하나 이상의 전임상 모델에서 평가될 수 있다 (이들 각각이 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, Barabino et al., *Experimental Eye Research* 2004, 79, 613-621 및 Schrader et al., *Developmental Ophthalmology*, Karger 2008, 41, 298-312). 이들 모델에서의 중점은 안구샘 및 눈 (각막, 등)의 조직병리 및 가능하게는 눈물 생산을 측정하는 고전적 쉬르머 시험 또는 이의 변형된 버전 (Barabino et al.)을 포함할 수 있다. 측정가능한 질환이 존재하기 이전 또는 후에 시작할 수 있는 다수의 투여 경로 (예를 들어, 전신 또는 국소)를 통한 투약에 의해 활성을 평가할 수 있다.

[0242] 제제는 당해 분야에서 교시된 것에 알려진 포도막염의 하나 이상의 전임상 모델에서 평가될 수 있다. 여기에는 비제한적으로, 실험적 자가면역 포도막염 (EAU) 및 내독소 유도된 포도막염 (EIU)의 모델이 포함된다. EAU 실험은 토끼, 랫트 또는 마우스에서 수행될 수 있으며 수동적인 또는 활성화 면역화를 포함할 수 있다. 예를 들어, 임의의 수 또는 망막 항원들을 사용하여 후에 동물이 동일한 항원으로 눈에 공격될 수 있는 관련된 면역원에 동물을 감염시킬 수 있다. EIU 모델은 보다 급성이고, 치사량 이하 용량에서 리포폴리사카라이드의 국소 또는 전신 투여를 수반한다. EIU 및 EAU 모델 둘 모두에 대한 중점은 다른 것들 중에서도 안저 검사, 조직병리를 포함할 수 있다. 이들 모델은 Smith et al. (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, *Immunology and Cell Biology* 1998, 76, 497-512)에 의해 검토되었다. 활성은 측정가능한 질환이 존재하기 이전 또는 후에 시작할 수 있는 다중 투여 경로 (예를 들어, 전신 또는 국소)를 통한 투약에 의해 평가된다. 상기에 열거된 일부 모델은 공막염/상공막염, 맥락막염, 모양체염, 또는 홍채염을 전개할 수 있고 따라서 이들 질환의 치료적 처치를 위한 화합물의 잠재적 활성을 조사하는 데 유용하다.

[0243] 제제는 또한 당해 분야에서 교시된 것에 알려진 결막염의 하나 이상의 전임상 모델에서 평가될 수 있다. 여기에는 비제한적으로, 기니아-피그, 랫트, 또는 마우스를 이용하는 설치류 모델이 포함된다. 기니아-피그 모델은

(본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, Groneberg, D.A., et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113에서 검토된) 난백알부민 또는 폐지풀과 항원으로 활성화 또는 수동적인 면역화 및/또는 면역 공격 프로토콜을 이용하는 모델을 포함한다. 랫트 및 마우스 모델은 일반 디자인면에서 (또한 Groneberg에 의해 검토된) 기니아-피그에서의 모델에 유사하다. 활성화는 측정가능한 질환이 존재하기 이전 또는 후에 시작할 수 있는 다중 투여 경로 (예를 들어, 전신 또는 국소)를 통한 투약에 의해 평가될 수 있다. 이러한 연구에 대한 중점은, 예를 들어, 안구 조직 예컨대 결막의 조직학적, 면역학적, 생화학적, 또는 분자의 분석을 포함할 수 있다.

[0244] 실시예 G: 생체내 뼈의 보호

[0245] 화합물은 당해 분야에서 교시된 것에 알려진 골감소증, 골다공증, 또는 골 흡수의 다양한 전임상 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 난소적출된 설치류를 사용하여 골 개형 및/또는 밀도의 징후 및 마커에 영향을 미치는 화합물의 능력을 평가할 수 있다 (본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, W.S.S. Jee and W. Yao, J Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 1(3), 193-207). 대안적으로, 골밀도 및 아키텍처는 요법 (예를 들어 글루코코르티코이드) 유도된 골감소증의 모델에서 대조군 또는 화합물 치료된 설치류에서 평가될 수 있다 (둘 모두가 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된, Yao, et al. Arthritis and Rheumatism, 2008, 58(6), 3485-3497; 및 상동 58(11), 1674-1686). 또한, 골 흡수 및 밀도에 대한 화합물의 효과는 상기 논의된 관절염의 설치류 모델에서 평가가능할 수 있다 (실시예 E). 모든 이들 모델에 대한 중점은 다양할 수 있지만 종종 조직학적 및 방사선학적 평가뿐만 아니라 골 개형의 면역조직학 및 적절한 생화학적 마커를 포함한다.

[0246] 본 발명의 수많은 실시형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 다른 실시형태는 하기 청구범위의 범위 내에 있다.