



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0063700
(43) 공개일자 2014년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7006956

(22) 출원일자(국제) 2012년09월20일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년03월14일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/068504

(87) 국제공개번호 WO 2013/041605
국제공개일자 2013년03월28일

(30) 우선권주장
11182020.5 2011년09월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
셀콤 리미티드
영국 티더블유8 9지에스 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980

(72) 발명자
램즈텐, 나이젤
영국 에스쥐8 7큐피 하트 하트퍼드셔 로이스톤 포울미어 그린 레인 스파로우스 라지
다고스틴, 클라우디오
영국 유케이 씨비1 9와이와이 케임브리지 케임브리지셔 로우 디어 클로즈 4

(74) 대리인
양영준, 양영환

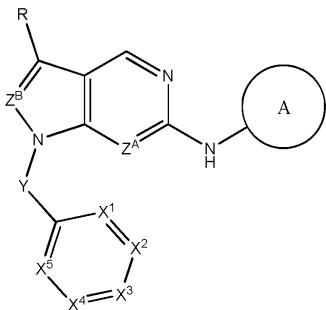
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 키나제 억제제로서의 피라졸로[4,3-C]파리딘 유도체

(57) 요 약

본 발명은 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

<화학식 I>



상기 식에서 X^1 내지 X^5 , Y , Z^A , Z^B , R 및 A 는 명세서 및 특허청구범위에 언급된 바와 같은 의미를 갖는다.

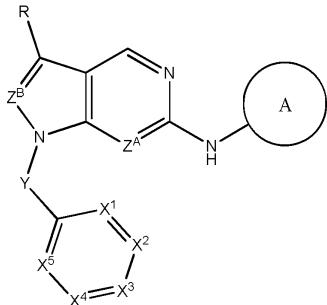
상기 화합물은 면역학적, 염증성, 자가면역, 알레르기성 장애, 및 면역학적으로-매개된 질환의 치료 또는 예방을 위한 키나제 억제제로서 유용하다. 본 발명은 또한 상기 화합물을 포함하는 제약 조성물 뿐만 아니라 의약으로서의 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

<화학식 I>



상기 식에서,

R은 H 또는 F이고;

Z^A 및 Z^B 는 독립적으로 CH; 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

고리 A는 폐닐, 나프틸, 방향족 5 내지 6원 헤테로시클릴; 또는 방향족 9 내지 11원 헤테로비시클릴이고, 여기서 고리 A는 하나 이상의 R^1 로 임의로 치환되고;

각각의 R^1 은 독립적으로 할로겐; CN; $C(O)OR^2$; OR^2 ; $C(O)R^2$; $C(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2N(R^2R^{2a})$; $S(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2R^2$; $S(O)R^2$; $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$; SR^2 ; $N(R^2R^{2a})$; NO_2 ; $OC(O)R^2$; $N(R^2)C(O)R^{2a}$; $N(R^2)S(O)_2R^{2a}$; $N(R^2)S(O)R^{2a}$; $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)C(O)OR^{2a}$; $OC(O)N(R^2R^{2a})$; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 또는 C_{2-6} 알키닐이고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

R^2 , R^{2a} , R^{2b} 는 독립적으로 H; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

R^3 은 할로겐; CN; $C(O)OR^4$; OR^4 ; $C(O)R^4$; $C(O)N(R^4R^{4a})$; $S(O)_2N(R^4R^{4a})$; $S(O)N(R^4R^{4a})$; $S(O)_2R^4$; $S(O)R^4$; $N(R^4)S(O)_2N(R^{4a}R^{4b})$; $N(R^4)S(O)N(R^{4a}R^{4b})$; SR^4 ; $N(R^4R^{4a})$; NO_2 ; $OC(O)R^4$; $N(R^4)C(O)R^{4a}$; $N(R^4)S(O)_2R^{4a}$; $N(R^4)S(O)R^{4a}$; $N(R^4)C(O)N(R^{4a}R^{4b})$; $N(R^4)C(O)OR^{4a}$; $OC(O)N(R^4R^{4a})$; 또는 T^1 이고;

R^4 , R^{4a} , R^{4b} 는 독립적으로 H; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

T^1 은 C_{3-7} 시클로알킬; 포화 4 내지 7원 헤테로시클릴; 또는 포화 7 내지 11원 헤�테로비시클릴이고, 여기서 T^1 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{10} 으로 임의로 치환되고;

Y는 $(C(R^5R^{5a}))_n$ 이고;

n은 0, 1, 2, 3 또는 4이고;

R^5 , R^{5a} 는 독립적으로 H; 및 비치환 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 함께 옥소 (=O)를 형성하고;

임의로, R^5 , R^{5a} 는 결합하여 비치환 C_{3-7} 시클로알킬을 형성하고;

X^1 은 $C(R^6)$ 또는 N 이고; X^2 는 $C(R^{6a})$ 또는 N 이고; X^3 은 $C(R^{6b})$ 또는 N 이고; X^4 는 $C(R^{6c})$ 또는 N 이고; X^5 는 $C(R^{6d})$ 또는 N 이며, 단, X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 중 2개 이하는 N 이고;

R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 는 독립적으로 R^{6e} ; H ; 할로겐; CN ; $C(O)OR^7$; OR^7 ; $C(O)R^7$; $C(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2N(R^7R^{7a})$; $S(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2R^7$; $S(O)R^7$; $N(R^7)S(O)_2N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)S(O)N(R^{7a}R^{7b})$; SR^7 ; $N(R^7R^{7a})$; NO_2 ; $OC(O)R^7$; $N(R^7)C(O)R^{7a}$; $N(R^7)S(O)_2R^{7a}$; $N(R^7)S(O)R^{7a}$; $N(R^7)C(O)N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)C(O)OR^{7a}$; $OC(O)N(R^7R^{7a})$; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{11} 로 임의로 치환되며, 단, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 하나는 R^{6e} 이고;

R^{6e} 는 $N(R^7)C(O)C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; $N(R^7)S(O)_2C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; 또는 $N(R^7)C(O)C≡C(R^{11a})$ 이고;

임의로 R^6/R^{6a} , R^{6a}/R^{6b} 쌍 중 한 쌍은 결합하여 고리 T^3 을 형성하고;

R^7 , R^{7a} , R^{7b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^8 로 임의로 치환되고;

R^8 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)S(O)N(R^{9a}R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; 또는 T^2 이고;

R^9 , R^{9a} , R^{9b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{12} 로 임의로 치환되고;

R^{10} 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^{13}$; OR^{13} ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^{13}$; $C(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2R^{13}$; $S(O)R^{13}$; $N(R^{13})S(O)_2N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})S(O)N(R^{13a}R^{13b})$; SR^{13} ; $N(R^{13}R^{13a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{13}$; $N(R^{13})C(O)R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)_2R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)R^{13a}$; $N(R^{13})C(O)N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})C(O)OR^{13a}$; $OC(O)N(R^{13}R^{13a})$; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 또는 C_{2-6} 알키닐이고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

R^{13} , R^{13a} , R^{13b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

R^{11} , R^{12} 는 독립적으로 할로겐; CN ; $C(O)OR^{15}$; OR^{15} ; $C(O)R^{15}$; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2R^{15}$; $S(O)R^{15}$; $N(R^{15})S(O)_2N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})S(O)N(R^{15a}R^{15b})$; SR^{15} ; $N(R^{15}R^{15a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{15}$; $N(R^{15})C(O)R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)_2R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)R^{15a}$; $N(R^{15})C(O)N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})C(O)OR^{15a}$; $OC(O)N(R^{15}R^{15a})$; 및 T^2 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^{11a} , R^{11b} , R^{11c} 는 독립적으로 H ; 할로겐; CN ; OR^{15} ; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터

선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

R^{15} , R^{15a} , R^{15b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

R^{14} 는 할로겐; CN ; $C(O)OR^{16}$; OR^{16} ; $C(O)R^{16}$; $C(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2R^{16}$; $S(O)R^{16}$; $N(R^{16})S(O)_2N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})S(O)N(R^{16a}R^{16b})$; SR^{16} ; $N(R^{16}R^{16a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{16}$; $N(R^{16})C(O)R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)_2R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)R^{16a}$; $N(R^{16})C(O)N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})C(O)OR^{16a}$; 또는 $OC(O)N(R^{16}R^{16a})$ 이고;

R^{16} , R^{16a} , R^{16b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

T^2 는 페닐; 나프틸; 인데닐; 인다닐; C_{3-7} 시클로알킬; 4 내지 7원 헤테로시클릴; 또는 7 내지 11원 헤테로비시클릴이고, 여기서 T^2 는 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{17} 로 임의로 치환되고;

T^3 은 페닐; C_{3-7} 시클로알킬; 또는 4 내지 7원 헤테로시클릴이고, 여기서 T^3 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{18} 로 임의로 치환되고;

R^{17} , R^{18} 은 독립적으로 할로겐; CN ; $C(O)OR^{19}$; OR^{19} ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^{19}$; $C(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2R^{19}$; $S(O)R^{19}$; $N(R^{19})S(O)_2N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})S(O)N(R^{19a}R^{19b})$; SR^{19} ; $N(R^{19}R^{19a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{19}$; $N(R^{19})C(O)R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)_2R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)R^{19a}$; $N(R^{19})C(O)N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})C(O)OR^{19a}$; $OC(O)N(R^{19}R^{19a})$; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{20} 으로 임의로 치환되고;

R^{19} , R^{19a} , R^{19b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{20} 으로 임의로 치환되고;

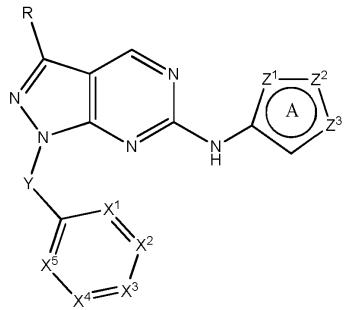
R^{20} 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^{21}$; OR^{21} ; $C(O)R^{21}$; $C(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2R^{21}$; $S(O)R^{21}$; $N(R^{21})S(O)_2N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})S(O)N(R^{21a}R^{21b})$; SR^{21} ; $N(R^{21}R^{21a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{21}$; $N(R^{21})C(O)R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)_2R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)R^{21a}$; $N(R^{21})C(O)N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})C(O)OR^{21a}$; 또는 $OC(O)N(R^{21}R^{21a})$ 이고;

R^{21} , R^{21a} , R^{21b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B 가 하기 화학식 Ia를 제공하도록 정의되는 것인 화합물.

<화학식 Ia>

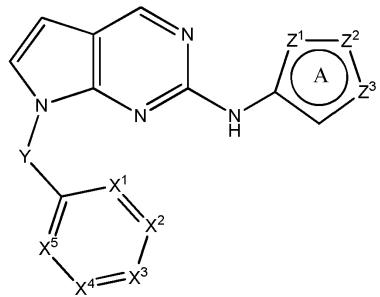


상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 중 적어도 하나는 N 이고; R , Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 제1항에 서와 같이 정의된다.

청구항 3

제1항에 있어서, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B , $R^{\circ 1}$ 하기 화학식 Ib를 제공하도록 정의되는 것인 화합물.

<화학식 Ib>

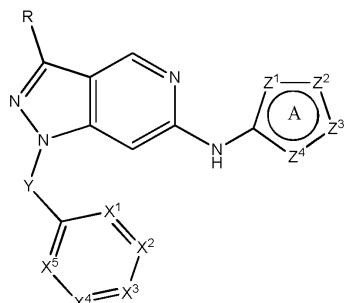


상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤�테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 중 적어도 하나는 N 이고; Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 제1항에서와 같이 정의된다.

청구항 4

제1항에 있어서, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B 가 하기 화학식 Ic를 제공하도록 정의되는 것인 화합물.

<화학식 Ic>



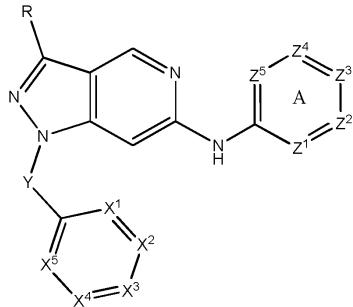
상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤�테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 중 적어도 하나는 N 또는 $N(R^1)$ 이고; R , Y , X^1 내지

X^5 및 R^1 은 제1항에서와 같이 정의된다.

청구항 5

제1항에 있어서, 화학식 I에서의 A , Z^A , Z^B 가 하기 화학식 Id를 제공하도록 정의되는 것인 화합물.

<화학식 Id>



상기 식에서, 고리 A에서 Z^1 은 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^2 는 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^3 은 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^4 는 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^5 는 $C(R^1)$ 또는 N 이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 중 2개 이하는 N 이고;

임의로 2개의 인접한 R^1 은 결합하여 Z^1 내지 Z^5 를 포함하는 고리와 함께 방향족 비시클릭 고리 T^0 을 형성하고;

T^0 은 방향족 9 내지 11원 헤테로비시클릴; 나프틸; 인데닐; 또는 인다닐이고, 여기서 T^0 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{1a} 로 임의로 치환되고;

R^{1a} 는 할로겐; CN ; $C(O)OR^2$; OR^2 ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^2$; $C(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2N(R^2R^{2a})$; $S(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2R$; $S(O)R^2$; $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$; SR^2 ; $N(R^2R^{2a})$; NO_2 ; $OC(O)R^2$; $N(R^2)C(O)R^{2a}$; $N(R^2)S(O)_2R^{2a}$; $N(R^2)S(O)R^{2a}$; $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)C(O)OR^{2a}$; $OC(O)N(R^2R^{2a})$; T^1 ; 또는 C_{1-6} 알킬이고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

R , R^1 , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^1 , Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 제1항에서와 같이 정의된다.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R 이 H 인 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, Y 가 CH_2 인 화합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 어느 것도 N 이 아니거나 그들 중 하나가 N 인 화합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 가 독립적으로 R^{6e} ; H ; 할로겐; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되며, 단, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 하나는 R^{6e} 인 화합물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, R^7 , R^{11a} , R^{11b} , R^{11c} 가 독립적으로 H; 및 C_{1-4} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-4} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되는 것인 화합물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, R^{6a} 가 R^{6e} 인 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, R^{6e} 가 $NHC(O)CH=CH_2$; $NHC(O)C(CH_3)=CH_2$; $NHC(O)CH=C(CH_3)_2$; $NHS(O)_2CH=CH_2$; 또는 $NHC(O)C\equiv CH$ 인 화합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 고리 A가 피라졸, 옥사졸, 이속사졸, 트리아졸, 페닐, 또는 피리딜 고리인 화합물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 0, 1, 또는 2개의 동일하거나 상이한 R^1 이 H가 아닌 것인 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, R^1 이 1 또는 2개의 동일하거나 상이한 R^3 으로 임의로 치환되는 C_{1-4} 알킬인 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, R^3 이 할로겐; CN; OR⁴; C(O)N(R⁴R^{4a}); 또는 C(O)T¹인 화합물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;

N-(2-플루오로-5-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)프로피올아미드;

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)에텐술폰아미드;

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)메타크릴아미드;

3-메틸-N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)부트-2-엔아미드;

N-(3-((2-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)메틸)페닐)에텐술폰아미드;

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-3-일)아미노)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;

N-(3-((2-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)메틸)페닐)아크릴아미드; 및

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드

로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 담체와 함께, 임의로 하나 이상의 다른 제약 조성물과 조합하여 포함하는 제약 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 증식성 질환의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 23

JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애의 치료 또는 예방용 의약을 제조하기 위한 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도.

청구항 24

JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 병태의 치료, 제어, 지연 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 상기 하나 이상의 병태를 치료, 제어, 지연 또는 예방하는 방법.

명세서**기술 분야**

[0001]

본 발명은 신호 전달, 증식, 및 시토카인 분비와 같은 세포 활성을 조절하기 위한 단백질 키나제 활성을 조절하는데 유용한, 제약상 허용되는 염을 포함하는 신규 부류의 키나제 억제제에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 키나제 활성, 특히 JAK3, BTK, BLK, ITK 및 TEC 활성, 및 상기 언급한 바와 같은 세포 활성과 관련된 신호 전달 경로를 억제하는 화합물을 제공한다. 더욱이, 본 발명은 예를 들어 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병의 치료 또는 예방을 위한 상기 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

키나제는 단백질, 지질, 당, 뉴클레오시드 및 기타 세포 대사산물의 인산화를 촉진시키고 진핵 세포 생리의 모든 측면에서 핵심적인 역할을 한다. 특히, 단백질 키나제 및 지질 키나제는 세포의 매개자 또는 자극, 예컨대 성장 인자, 시토카인 또는 케모카인에 반응하여 세포의 활성화, 성장, 분화 및 생존을 제어하는 신호전달 현상에 관여한다. 일반적으로, 단백질 키나제는 우선적으로 티로신 잔기를 인산화시키는 것 및 우선적으로 세린 및 /또는 트레오닌 잔기를 인산화시키는 것의 두 그룹으로 분류된다. 티로신 키나제는 막-관통 성장 인자 수용체, 예컨대 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 및 시토졸 비-수용체 키나제, 예컨대 TEC 키나제 및 앤누스(Janus) 키나제 (JAK)를 포함한다.

[0003]

키나제의 TEC 패밀리는 5개의 구성원 (TEC, BTK, ITK, RLK 및 BMX)을 포함하며 이는 주로 조혈 세포에 의해 발

현되고 면역 수용체, 예전대 고친화도 IgE 수용체 (Fc ε RI), T 세포 항원 수용체 (TCR) 및 B 세포 수용체 (BCR)를 통해 신호전달에서 핵심적인 역할을 한다. TEC 패밀리의 구성원은 공통 단백질 도메인 구성을 공유한다. 이들은 아미노-말단 플렉스트린 상동 (Pleckstrin Homology: PH) 도메인, 1 또는 2개의 프롤린-풍부 영역을 갖는 TEC 상동 도메인, SRC 상동 3 (SH3) 및 2 (SH2) 단백질 상호작용 도메인 및 카르복시-말단 키나제 도메인을 갖는다. TEC 패밀리 키나제의 활성화는 몇몇 단계를 필요로 한다: 그의 플렉스트린 상동 도메인을 통해 혈장 막으로의 동원, SRC 패밀리 키나제에 의한 인산화 및 이들을 면역 수용체 신호전달 복합체의 부근으로 이동시키는 단백질과의 상호작용 (문헌 [Schwartzberg et al., 2005, *Nature Reviews Immunology* 5, 284-295]).

[0004] TEC 패밀리 키나제는 B 세포 발생 및 활성화에 필수적이다. 돌연변이된 BTK를 갖는 환자는 B 세포 발생에서 차단을 나타내고 이로써 B 세포 및 혈장 세포의 거의 완전한 부재, 감소된 면역글로불린 수준 및 손상된 체액 면역 반응이 초래된다.

[0005] 게다가, TEC 키나제는 고친화도 IgE 수용체 (Fc ε RI)를 통해 비만 세포 활성화에서 역할을 한다. ITK 및 BTK는 비만 세포에서 발현되고 Fc ε RI 가교에 의해 활성화된다. 급성 및 후기(late phase) 염증성 알레르기 반응은 기도를 통해 항원 투입시 ITK-결핍 마우스에서 상당히 감소된다. 중요하게는, 기도 비만 세포 탈과립은 항원-특이적 IgE 및 IgG1의 야생형 수준에도 불구하고 손상된다 (문헌 [Forsell et al., 2005, *Am. J. Respir. Cell Mol. Bio.* 32, 511-520]).

[0006] T 세포는 3개의 TEC 키나제 (ITK, RLK 및 TEC)를 발현하며 이는 T-세포 수용체(TCR)의 하류에서 활성화되고 TCR 신호전달에 관여한다. Itk 단백질을 코딩하는 유전자가 결실되는 유전자 조작된 마우스의 연구는 Itk의 생리학상 및 병리생리학상 기능에 관한 중요한 정보를 제공한다. Itk-결핍 ($Itk^{-/-}$) 마우스는 T 헬퍼 2 (T_{H2}) 세포 반응에서 특이적 결합 및 알레르기성 천식의 모델에서 감소된 병상을 갖는다. 역으로, ITK 발현은 아토피 피부염, T_{H2} -세포 매개 질환을 갖는 환자로부터 T 세포에서 증가된다. 따라서 ITK는 T_{H2} -세포-매개 질환에 관한 치료 표적으로서 제안되었다 (문헌 [Schwartzberg et al., 2005, *Nature Reviews Immunology* 5, 284-295]).

[0007] 최근 약물 개발의 초점이 되어 온 키나제 중 또 다른 군은 비-수용체 티로신 키나제의 야누스 키나제 (JAK) 패밀리이다. 포유동물에서, 상기 패밀리는 4개의 구성원, JAK1, JAK2, JAK3 및 티로신 키나제 2 (TYK2)를 갖는다. 각각의 단백질은 키나제 도메인 및 촉매적으로 불활성인 유사(pseudo)-키나제 도메인을 갖는다. JAK 단백질은 그의 아미노-말단 FERM (밴드-4.1, 에즈린, 라덕신, 모에신) 도메인을 통해 시토카인 수용체에 결합한다. 시토카인과 그의 수용체의 결합 후, JAK는 활성화되고 수용체를 인산화하며, 그로 인해 신호전달 분자를 위한, 특히 신호 전달자 및 전사 활성제 (Stat) 패밀리의 구성원을 위한 도킹 부위를 창출한다 (문헌 [Yamaoka et al., 2004. *The Janus kinases (Jaks)*. *Genome Biology* 5(12): 253]).

[0008] 포유동물에서, JAK1, JAK2 및 TYK2는 편재하여 발현된다. 그에 반해서, JAK3의 발현은 주로 조혈 세포에 존재하며 이는 세포 발생 및 활성화에 의해 고도로 조절된다 (문헌 [Musso et al., 1995. *181(4): 1425-31*]).

[0009] JAK-결핍 세포주 및 유전자-표적화된 마우스의 연구를 통해 시토카인 신호전달에서의 JAK의 본질적인 중복되지 않는 기능이 밝혀졌다. JAK1 녹아웃 마우스는 흡인(sucking)을 방지하는 신경학적 작용과 연관될 가능성이 있는, 주산기 치사 표현형을 나타낸다 (문헌 [Rodig et al., 1998. *Cell* 93(3):373-83]). JAK2 유전자의 결실의 결과 적혈구생성의 결함의 결과로서 배아기 12.5일에서의 배아 치사가 야기된다 (문헌 [Neubauer et al., 1998. *Cell* 93(3):397-409]). 흥미롭게도, JAK3 결핍은 상염색체 열성 중증 복합형 면역결핍 (SCID)의 인간에서 처음 확인되었다 (문헌 [Macchi et al., 1995. *Nature* 377(6544):65-68]). JAK3 녹아웃 마우스 역시 SCID를 나타내지만 비-면역 결함을 나타내지 않으며, 이는 면역억제제로서의 JAK3의 억제제는 생체내에서 제한된 영향을 미칠 수 있고 따라서 면역억제를 위한 유망한 약물을 제시한다는 것을 시사한다 (문헌 [Papageorgiou and Wikman 2004, *Trends in Pharmacological Sciences* 25(11):558-62]).

[0010] JAK3에 대한 활성화 돌연변이는 급성 거대핵모세포성 백혈병 (AMKL) 환자에서 관찰되었다 (문헌 [Walters et al., 2006. *Cancer Cell* 10(1):65-75]). 이들 JAK3의 돌연변이 형태는 마우스 모델에서 Ba/F3 세포를 인자-독립적 성장으로 형질전환시키고 거대핵모세포성 백혈병의 특징을 유발할 수 있다.

[0011] JAK3 억제와 연관된 질환 및 장애는 예를 들어 WO 01/42246 및 WO 2008/060301에 추가로 기재되어 있다.

[0012] 몇몇 JAK3 억제제가 의약 분야에서 유용할 수 있는 문헌에 보고되어 있다 (문헌 [O'Shea et al., 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(7):555-64]). 강력한 JAK3 억제제 (CP-690,550)는 기관 이식의 동물 모델에서 (문헌 [Changelian et al., 2003, *Science* 302(5646):875-888]) 및 임상 시험에서 (문헌 [Pesu et al., 2008.

Immunol. Rev. 223, 132-142]에서 검토됨) 효능을 나타내는 것으로 보고되었다. CP-690,550 억제제는 JAK3 키나제에 선택적이지 않으며 거의 동등하게 JAK2 키나제를 억제한다 (문헌 [Jiang et al., 2008, J. Med. Chem. 51(24):8012-8018]). JAK2보다 더 강력하게 JAK3을 억제하는 선택적인 JAK3 억제제는 JAK2의 억제가 빈혈을 야기할 수 있기 때문에 유리한 치료 특성을 가질 수 있는 것으로 기대된다 (문헌 [Ghoreschi et al., 2009. Nature Immunol. 4, 356-360]).

[0013] JAK3 및 JAK2 키나제 억제 활성을 발휘하는 피리미딘 유도체가 WO-A 2008/009458에 기재되어 있다. JAK 경로를 조절하거나 JAK 키나제, 특히 JAK3을 억제하는 병태의 치료에서의 피리미딘 화합물이 WO-A 2008/118822 및 WO-A 2008/118823에 기재되어 있다.

[0014] JAK3 억제제로서 플루오로 치환 피리미딘 화합물은 WO-A 2010/118986에 기재되어 있다. JAK 억제제로서 헤테로 시클릴 피라졸로피리미딘 유사체는 WO-A 2011/048082에 기재되어 있다.

[0015] 피롤로피리미딘 화합물은 WO 2009/098236 A1, WO 2010/100431 A1 및 WO 2010/129053 A2에 기재되어 있다.

[0016] 피라졸로피리딘 및 그의 제조는 WO 2006/063820 A1, WO2011/019780 A1 및 문헌 [R.V. Fucini et al., Bioorg. & Med. Chem. Lett. 18 (2008), 5648-5652]로부터 공지되어 있다.

[0017] Jak 억제제는 또한 출원 번호가 PCT/EP2012/056887, PCT/EP2012/064510 및 PCT/EP2012/064512인 국제특허출원 뿐만 아니라 WO 2012/022681 A2에도 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

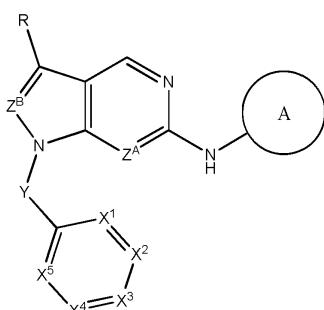
[0018] 비록 JAK 억제제들이 당업계에 공지되어 있긴 하지만, 활성, 특히 JAK2 키나제에 대한 선택성, 및 ADME 특성과 같은 더욱 효과적인 제약 관련 특성을 적어도 부분적으로 갖는 추가적인 JAK 억제제를 제공할 필요성이 존재한다.

[0019] 따라서, 본 발명의 목적은 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 장애의 치료 또는 예방에서 효과적일 수 있는 신규 부류의 키나제 억제제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0020] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0021] <화학식 I>



[0022]

[0023] 상기 식에서,

[0024] R은 H 또는 F이고;

[0025] Z^A 및 Z^B는 독립적으로 CH₂ 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0026] 고리 A는 폐닐, 나프틸, 방향족 5 내지 6원 헤테로시클릴; 또는 방향족 9 내지 11원 헤테로비시클릴이고, 여기서 고리 A는 하나 이상의 R¹로 임의로 치환되고;

[0027] 각각의 R¹은 독립적으로 할로겐; CN; C(O)OR²; OR²; C(O)R²; C(O)N(R²R^{2a}); S(O)N(R²R^{2a}); S(O)N(R²R^{2a}); S(O)R²;

$S(O)R^2$; $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$; SR^2 ; $N(R^2R^{2a})$; NO_2 ; $OC(O)R^2$; $N(R^2)C(O)R^{2a}$; $N(R^2)S(O)_2R^{2a}$; $N(R^2)S(O)R^{2a}$; $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)C(O)OR^{2a}$; $OC(O)N(R^2R^{2a})$; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 또는 C_{2-6} 알키닐이 고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

[0028] R^2 , R^{2a} , R^{2b} 는 독립적으로 H ; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

[0029] R^3 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^4$; OR^4 ; $C(O)R^4$; $C(O)N(R^{4a}R^{4b})$; $S(O)_2N(R^4R^{4a})$; $S(O)N(R^4R^{4a})$; $S(O)_2R^4$; $S(O)R^4$; $N(R^4)S(O)_2N(R^{4a}R^{4b})$; $N(R^4)S(O)N(R^{4a}R^{4b})$; SR^4 ; $N(R^4R^{4a})$; NO_2 ; $OC(O)R^4$; $N(R^4)C(O)R^{4a}$; $N(R^4)S(O)_2R^{4a}$; $N(R^4)S(O)R^{4a}$; $N(R^4)C(O)N(R^{4a}R^{4b})$; $N(R^4)C(O)OR^{4a}$; $OC(O)N(R^4R^{4a})$; 또는 T^1 이고;

[0030] R^4 , R^{4a} , R^{4b} 는 독립적으로 H ; T^1 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

[0031] T^1 은 C_{3-7} 시클로알킬; 포화 4 내지 7원 헤테로시클릴; 또는 포화 7 내지 11원 헤테로비시클릴이고, 여기서 T^1 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{10} 으로 임의로 치환되고;

[0032] Y 는 $(C(R^{5a}R^{5a}))_n$ 이고;

[0033] n 은 0, 1, 2, 3 또는 4이고;

[0034] R^5 , R^{5a} 는 독립적으로 H ; 및 비치환 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 함께 옥소 ($=O$)를 형성하고;

[0035] 임의로, R^5 , R^{5a} 는 결합하여 비치환 C_{3-7} 시클로알킬을 형성하고;

[0036] X^1 은 $C(R^6)$ 또는 N 이고; X^2 는 $C(R^{6a})$ 또는 N 이고; X^3 은 $C(R^{6b})$ 또는 N 이고; X^4 는 $C(R^{6c})$ 또는 N 이고; X^5 는 $C(R^{6d})$ 또는 N 이며, 단, X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 중 2개 이하는 N 이고;

[0037] R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 는 독립적으로 R^{6e} ; H ; 할로겐; CN ; $C(O)OR^7$; OR^7 ; $C(O)R^7$; $C(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2N(R^7R^{7a})$; $S(O)N(R^7R^{7a})$; $S(O)_2R^7$; $S(O)R^7$; $N(R^7)S(O)_2N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)S(O)N(R^{7a}R^{7b})$; SR^7 ; $N(R^7R^{7a})$; NO_2 ; $OC(O)R^7$; $N(R^7)C(O)R^{7a}$; $N(R^7)S(O)_2R^{7a}$; $N(R^7)S(O)R^{7a}$; $N(R^7)C(O)N(R^{7a}R^{7b})$; $N(R^7)C(O)OR^{7a}$; $OC(O)N(R^7R^{7a})$; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{11} 로 임의로 치환되며, 단, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 하나는 R^{6e} 이고;

[0038] R^{6e} 는 $N(R^7)C(O)C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; $N(R^7)S(O)_2C(R^{11a})=C(R^{11b}R^{11c})$; 또는 $N(R^7)C(O)C\equiv C(R^{11a})$ 이고;

[0039] 임의로 R^6/R^{6a} , R^{6a}/R^{6b} 쌍 중 한 쌍은 결합하여 고리 T^3 을 형성하고;

[0040] R^7 , R^{7a} , R^{7b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^8 로 임의로 치환되고;

[0041] R^8 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)S(O)N(R^{9a}R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$;

$N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; 또는 T^2 이고;

[0042] R^9 , R^{9a} , R^{9b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{12} 로 임의로 치환되고;

[0043] R^{10} 은 할로겐; CN ; $C(O)OR^{13}$; OR^{13} ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^{13}$; $C(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2R^{13}$; $S(O)R^{13}$; $N(R^{13})S(O)_2N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})S(O)N(R^{13a}R^{13b})$; SR^{13} ; $N(R^{13}R^{13a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{13}$; $N(R^{13})C(O)R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)_2R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)R^{13a}$; $N(R^{13})C(O)N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})C(O)OR^{13a}$; $OC(O)N(R^{13}R^{13a})$; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 또는 C_{2-6} 알키닐이고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

[0044] R^{13} , R^{13a} , R^{13b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

[0045] R^{11} , R^{12} 는 독립적으로 할로겐; CN ; $C(O)OR^{15}$; OR^{15} ; $C(O)R^{15}$; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)N(R^{15}R^{15a})$; $S(O)_2R^{15}$; $S(O)R^{15}$; $N(R^{15})S(O)_2N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})S(O)N(R^{15a}R^{15b})$; SR^{15} ; $N(R^{15}R^{15a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{15}$; $N(R^{15})C(O)R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)R^{15a}$; $N(R^{15})S(O)R^{15a}$; $N(R^{15})C(O)N(R^{15a}R^{15b})$; $N(R^{15})C(O)OR^{15a}$; $OC(O)N(R^{15}R^{15a})$; 및 T^2 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0046] R^{11a} , R^{11b} , R^{11c} 는 독립적으로 H ; 할로겐; CN ; OR^{15} ; $C(O)N(R^{15}R^{15a})$; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{14} 로 임의로 치환되고;

[0047] R^{15} , R^{15a} , R^{15b} 는 독립적으로 H ; T^2 ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

[0048] R^{14} 는 할로겐; CN ; $C(O)OR^{16}$; OR^{16} ; $C(O)R^{16}$; $C(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)N(R^{16}R^{16a})$; $S(O)_2R^{16}$; $S(O)R^{16}$; $N(R^{16})S(O)_2N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})S(O)N(R^{16a}R^{16b})$; SR^{16} ; $N(R^{16}R^{16a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{16}$; $N(R^{16})C(O)R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)_2R^{16a}$; $N(R^{16})S(O)R^{16a}$; $N(R^{16})C(O)N(R^{16a}R^{16b})$; $N(R^{16})C(O)OR^{16a}$; 또는 $OC(O)N(R^{16}R^{16a})$ 이고;

[0049] R^{16} , R^{16a} , R^{16b} 는 독립적으로 H ; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되고;

[0050] T^2 는 페닐; 나프틸; 인데닐; 인다닐; C_{3-7} 시클로알킬; 4 내지 7원 헤테로시클릴; 또는 7 내지 11원 헤테로비시클릴이고, 여기서 T^2 는 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{17} 로 임의로 치환되고;

[0051] T^3 은 페닐; C_{3-7} 시클로알킬; 또는 4 내지 7원 헤테로시클릴이고, 여기서 T^3 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{18} 로 임의로 치환되고;

[0052] R^{17} , R^{18} 은 독립적으로 할로겐; CN ; $C(O)OR^{19}$; OR^{19} ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^{19}$; $C(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)N(R^{19}R^{19a})$; $S(O)_2R^{19}$; $S(O)R^{19}$; $N(R^{19})S(O)_2N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})S(O)N(R^{19a}R^{19b})$; SR^{19} ; $N(R^{19}R^{19a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{19}$; $N(R^{19})C(O)R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)_2R^{19a}$; $N(R^{19})S(O)R^{19a}$;

$N(R^{19})C(O)N(R^{19a}R^{19b})$; $N(R^{19})C(O)OR^{19a}$; $OC(O)N(R^{19}R^{19a})$; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{20} 으로 임의로 치환되고;

[0053] R^{19} , R^{19a} , R^{19b} 는 독립적으로 H; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{20} 으로 임의로 치환되고;

[0054] R^{20} 은 할로겐; CN; $C(O)OR^{21}$; OR^{21} ; $C(O)R^{21}$; $C(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)N(R^{21}R^{21a})$; $S(O)_2R^{21}$; $S(O)R^{21}$; $N(R^{21})S(O)_2N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})S(O)N(R^{21a}R^{21b})$; SR^{21} ; $N(R^{21}R^{21a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{21}$; $N(R^{21})C(O)R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)_2R^{21a}$; $N(R^{21})S(O)R^{21a}$; $N(R^{21})C(O)N(R^{21a}R^{21b})$; $N(R^{21})C(O)OR^{21a}$; 또는 $OC(O)N(R^{21}R^{21a})$ 이고;

[0055] R^{21} , R^{21a} , R^{21b} 는 독립적으로 H; C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬; C_{2-6} 알케닐; 및 C_{2-6} 알키닐은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환된다.

발명의 효과

[0056] 놀랍게도 - 이론에 얹매이지 않고 - 본 발명의 화합물은 그의 단백질 표적과 공유 결합을 형성하는 키나제 억제제로서 작용할 수 있고, 따라서 비공유 억제제와 비교하여 유리한 특성을 가질 수 있는데, 그 이유는 이들이 그의 표적 단백질에 비가역적으로 결합하여 영구적으로 불활성화시킬 수 있기 때문인 것으로 밝혀졌다. 표적의 비가역적 억제 후, 단백질의 재합성은 그의 기능을 회복하기 위해 필수적일 수 있다. 따라서, 약물 작용의 연장된 지속기간은 약동학적 노출로부터 약물의 약역학을 분리할 수 있다 (문헌 [Singh et al., 2011. Nat. Rev. Drug Discov. 10(4): 307-317]; [Singh et al., 2010. Curr. Opin. Chem. Biol. 14(4):475-480]).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 변수 또는 치환기가, 상이한 변형의 군으로부터 선택될 수 있고, 이러한 변수 또는 치환기가 1회 넘게 있는 경우, 각각의 변형은 동일 또는 상이할 수 있다.

[0058] 본 발명의 의미 내에서 용어들은 다음과 같이 사용된다:

[0059] 용어 "임의로 치환된"은 비치환되거나 치환됨을 의미한다. 일반적으로 - 이에 제한되지 않지만 -, "하나 이상의 치환기"는 1, 2 또는 3개, 바람직하게는 1 또는 2개, 더욱 바람직하게는 1개의 치환기를 의미한다. 일반적으로 이들 치환기는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0060] "알킬"은 직쇄형 또는 분지형 탄화수소 쇄를 의미한다. 알킬 탄소의 각각의 수소는 본원에서 추가로 명시된 바와 같은 치환기로 대체될 수 있다.

[0061] " C_{1-4} 알킬"은 1 - 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬 쇄를 의미하며, 예를 들어 분자의 말단에 존재하는 경우: 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 또는 예를 들어 $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$ (분자의 2개의 모이어티가 알킬기로 연결되는 경우)를 의미한다. C_{1-4} 알킬 탄소의 각각의 수소는 본원에서 추가로 명시된 바와 같은 치환기로 대체될 수 있다.

[0062] " C_{1-6} 알킬"은 1 - 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 쇄를 의미하며, 예를 들어 분자의 말단에 존재하는 경우: C_{1-4} 알킬, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, n-헥실, 또는 예를 들어 $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$ (분자의 2개의 모이어티가 알킬기로 연결되는 경우)를 의미한다. C_{1-6} 알킬 탄소의 각각의 수소는 본원에서 추가로 명시된 바와 같은 치환기로 대체될 수 있다.

[0063] " C_{3-7} 시클로알킬" 또는 " C_{3-7} 시클로알킬 고리"는 3 - 7개의 탄소 원자를 갖는 시클릭 알킬 쇄를 의미하며, 예를 들어 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헵틸을 의미한다. 바람직하게

는, 시클로알킬은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 또는 시클로헵틸을 지칭한다. 시클로알킬 탄소의 각각의 수소는 본원에서 추가로 명시된 바와 같은 치환기로 대체될 수 있다. 용어 "C₃₋₅ 시클로알킬" 또는 "C₃₋₅ 시클로알킬 고리"는 이에 준해 정의된다.

[0064] "할로겐"은 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도를 의미한다. 일반적으로 할로겐은 플루오로 또는 클로로인 것이 바람직하다.

[0065] "4 내지 7원 헤테로시클릴" 또는 "4 내지 7원 헤테로사이클"은 이중 결합을 최대 개수까지 함유할 수 있는 4, 5, 6 또는 7개의 고리 원자를 갖는 고리 (완전히, 부분적으로 또는 불포화된 방향족 또는 비방향족 고리)를 의미하며, 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 4개까지의 고리 원자는 황 (-S(0)-, -S(0)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(0)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자로 대체되고 여기서 고리는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된다. 4 내지 7원 헤테로사이클에 대한 예는, 아제티딘, 옥세탄, 티에탄, 푸란, 티오펜, 피롤, 피롤린, 이미다졸, 이미다졸린, 피라졸, 피라졸린, 옥사졸, 옥사졸린, 이속사졸, 이속사졸린, 티아졸, 티아졸린, 이소티아졸, 이소티아졸린, 티아디아졸, 티아디아졸린, 테트라히드로푸란, 테트라히드로티오펜, 피롤리딘, 이미다졸리딘, 피라졸리딘, 옥사졸리딘, 이속사졸리딘, 티아졸리딘, 이소티아졸리딘, 티아디아졸리딘, 술풀란, 피란, 디히드로피란, 테트라히드로피란, 이미다졸리딘, 피리딘, 피리다진, 피라진, 피리미딘, 피페라진, 피페리딘, 모르폴린, 테트라졸, 트리아졸, 트리아졸리딘, 테트라졸리딘, 디아제판, 아제핀 또는 호모피페라진이다. 용어 "5 내지 6원 헤�테로시클릴" 또는 "5 내지 6원 헤�테로사이클"은 이에 준해 정의된다.

[0066] "포화 4 내지 7원 헤�테로시클릴" 또는 "포화 4 내지 7원 헤�테로사이클"은 완전 포화 "4 내지 7원 헤�테로시클릴" 또는 "4 내지 7원 헤�테로사이클"을 의미한다.

[0067] "방향족 5 내지 6원 헤�테로시클릴" 또는 "방향족 5 내지 6원 헤�테로사이클"은 시클로펜타디에닐 또는 벤젠 유래의 헤�테로사이클을 의미하며, 여기서 적어도 1개의 탄소 원자는 황 (-S(0)-, -S(0)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(0)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤�테로원자로 대체된다. 이러한 헤�테로사이클에 대한 예는 푸란, 티오펜, 피롤, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 이속사졸, 티아졸, 이소티아졸, 티아디아졸, 트리아졸, 테트라졸, 피리딘, 피리미딘, 피리다진, 피라진, 트리아진이다.

[0068] "방향족 5원 헤�테로시클릴" 또는 "방향족 5원 헤�테로사이클"은 시클로펜타디에닐 유래의 헤�테로사이클을 의미하며, 여기서 적어도 1개의 탄소 원자는 황 (-S(0)-, -S(0)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(0)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤�테로원자로 대체된다. 이러한 헤�테로사이클의 예는 푸란, 티오펜, 피롤, 이미다졸, 피라졸, 옥사졸, 이속사졸, 티아졸, 이소티아졸, 티아디아졸, 트리아졸, 테트라졸이다.

[0069] "7 내지 11원 헤테로비시클릴" 또는 "7 내지 11원 헤�테로비사이클"은 7 내지 11개의 고리 원자를 갖는 2개의 고리의 헤테로시클릭 시스템을 의미하며, 여기서 적어도 1개의 고리 원자는 고리 둘 다에 의해 공유되며, 이중 결합을 최대 개수까지 함유할 수 있고 (완전히, 부분적으로 또는 불포화된 방향족 또는 비방향족 고리), 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 6개까지의 고리 원자는 황 (-S(0)-, -S(0)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(0)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤�테로원자로 대체되고 여기서 고리는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된다. 7 내지 11원 헤�테로비사이클에 대한 예는, 인돌, 인돌린, 벤조푸란, 벤조티오펜, 벤족사졸, 벤즈이속사졸, 벤조티아졸, 벤즈이소티아졸, 벤즈이미다졸, 벤즈이미다졸린, 퀴놀린, 퀴나졸린, 디히드로퀴나졸린, 퀴놀린, 디히드로퀴놀린, 테트라히드로퀴놀린, 데카히드로퀴놀린, 이소퀴놀린, 데카히드로이소퀴놀린, 테트라히드로이소퀴놀린, 디히드로이소퀴놀린, 벤즈아제핀, 퓨린 또는 프테리딘이다. 용어 7 내지 11원 헤�테로비사이클로는 또한 2개의 고리의 스피로 구조, 예컨대 6-옥사-2-아자스피로[3,4]옥탄, 2-옥사-6-아자스피로[3,3]헵탄-6-일 또는 2,6-디아자스피로[3,3]헵탄-6-올 또는 가교 헤�테로사이클, 예컨대 8-아자-비시클로[3.2.1]옥탄 또는 2,5-디아자비시클로[2,2,2]옥탄-2-일 또는 3,8-디아자비시클로[3.2.1]옥탄이 포함된다.

[0070] "포화 7 내지 11원 헤�테로비시클릴" 또는 "포화 7 내지 11원 헤�테로비사이클"은 완전 포화 7 내지 11원 헤�테로비시클릴 또는 7 내지 11원 헤�테로비사이클을 의미한다.

[0071] "방향족 9 내지 11원 헤�테로비시클릴" 또는 "방향족 9 내지 11원 헤�테로비사이클"은 2개의 고리의 헤�테로시클릭 시스템을 의미하며, 여기서 적어도 1개의 고리는 방향족이고 여기서 헤�테로시클릭 시스템은 9 내지 11개의 고리 원자를 갖고, 여기서 2개의 고리 원자는 고리 둘 다에 의해 공유되며, 이중 결합을 최대 개수까지 함유할 수 있고 (완전 또는 부분적 방향족), 여기서 적어도 1개의 고리 원자 내지 6개까지의 고리 원자는 황 (-S(0)-, -S(0)₂- 포함), 산소 및 질소 (=N(0)- 포함)로 이루어진 군으로부터 선택된 헤�테로원자로 대체되고 여기서 고리

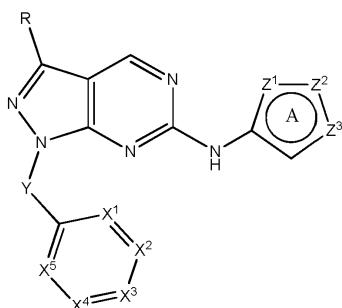
는 탄소 또는 질소 원자를 통해 분자의 나머지에 연결된다. 방향족 9 내지 11원 헤테로비사이클에 대한 예는 인돌, 인돌린, 벤조푸란, 벤조티오펜, 벤족사졸, 벤즈이속사졸, 벤조티아졸, 벤즈이소티아졸, 벤즈이미다졸, 벤즈이미다졸린, 퀴놀린, 퀴나졸린, 디히드로퀴나졸린, 디히드로퀴놀린, 테트라히드로퀴놀린, 이소퀴놀린, 테트라히드로이소퀴놀린, 디히드로이소퀴놀린, 벤즈아제핀, 퓨린 또는 프테리딘이다.

[0072] 바람직한 화학식 I의 화합물은 그 안에 함유된 잔기들 중 하나 이상이 하기에 제공된 의미를 갖는 화합물이며, 바람직한 치환기 정의의 모든 조합은 본 발명의 대상이다. 모든 바람직한 화학식 I의 화합물과 관련하여, 본 발명은 또한 모든 호변이성질체 및 입체이성질체 형태, 및 모든 비율의 그의 혼합물, 및 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0073] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 하기에 언급된 치환기는 독립적으로 다음의 의미를 갖는다. 따라서, 이들 치환기들 중 하나 이상은 하기에 제공된 바람직한 의미 또는 더욱 바람직한 의미를 가질 수 있다.

[0074] 바람직하게는, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B 는 하기 화학식 Ia를 제공하도록 정의된다.

[0075] <화학식 Ia>

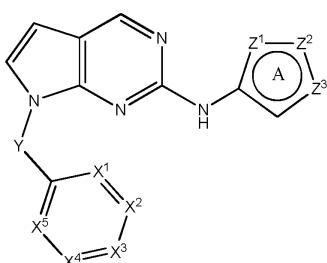


[0076]

[0077] 상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 중 적어도 하나는 N이고; R , Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 상기에 정의되어 있다.

[0078] 바람직하게는, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B , R 은 하기 화학식 Ib를 제공하도록 정의된다.

[0079] <화학식 Ib>



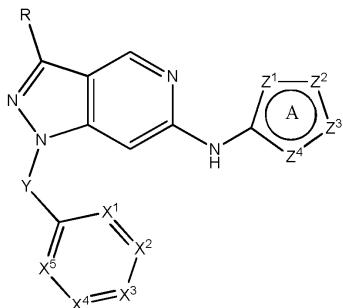
[0080]

[0081] 상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 중 적어도 하나는 N이고; Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 상기에 정의되어 있다.

[0082] 바람직하게는, 화학식 I에서의 고리 A, Z^A , Z^B 는 하기 화학식 Ic를 제공하도록 정의된다.

[0083]

<화학식 Ic>



[0084]

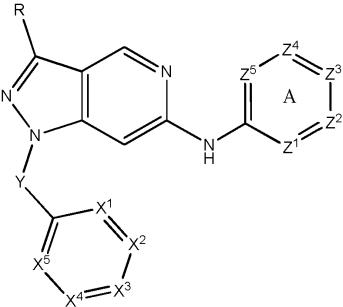
상기 식에서, 고리 A는 방향족 5원 헤테로사이클이고, 여기서 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 독립적으로 $C(R^1)$, N , $N(R^1)$, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 중 적어도 하나는 N 또는 $N(R^1)$ 이고; R , Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 상기에 정의되어 있다.

[0085]

바람직하게는, 화학식 I에서의 A, Z^A , Z^B 는 하기 화학식 Id를 제공하도록 정의된다.

[0086]

<화학식 Id>



[0087]

상기 식에서, 고리 A에서 Z^1 은 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^2 는 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^3 은 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^4 는 $C(R^1)$ 또는 N 이고; Z^5 는 $C(R^1)$ 또는 N 이며, 단, Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 , Z^5 중 2개 이하는 N 이고;

[0088]

임의로 2개의 인접한 R^1 은 결합하여 Z^1 내지 Z^5 를 포함하는 고리와 함께 방향족 비시클릭 고리 T^0 을 형성하고;

[0089]

T^0 은 방향족 9 내지 11원 헤테로비시클릴; 나프틸; 인데닐; 또는 인다닐이고, 여기서 T^0 은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^{1a} 로 임의로 치환되고;

[0090]

R^{1a} 는 할로겐; CN ; $C(O)OR^2$; OR^2 ; 옥소 ($=O$) (여기서 고리는 적어도 부분적으로 포화됨); $C(O)R^2$; $C(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2N(R^2R^{2a})$; $S(O)N(R^2R^{2a})$; $S(O)_2R$; $S(O)R^2$; $N(R^2)S(O)_2N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)S(O)N(R^{2a}R^{2b})$; SR^2 ; $N(R^2R^{2a})$; NO_2 ; $OC(O)R^2$; $N(R^2)C(O)R^{2a}$; $N(R^2)S(O)_2R^{2a}$; $N(R^2)S(O)R^{2a}$; $N(R^2)C(O)N(R^{2a}R^{2b})$; $N(R^2)C(O)OR^{2a}$; $OC(O)N(R^2R^{2a})$; T^1 ; 또는 C_{1-6} 알킬이고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 R^3 으로 임의로 치환되고;

[0091]

R , R^1 , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , Y , X^1 내지 X^5 및 R^1 은 상기에 정의되어 있다.

[0092]

바람직하게는, R 은 H 이다.

[0093]

바람직하게는, Y 는 CH_2 이다.

[0094]

바람직하게는, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 어느 것도 N 이 아니거나 그들 중 하나가 N 이다 (더욱 바람직하게는 어느 것도 N 이 아님).

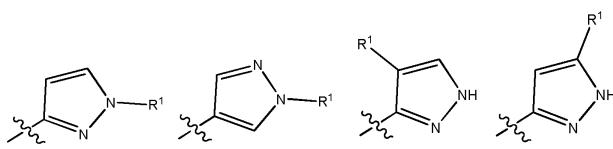
[0097] 바람직하게는, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 는 독립적으로 R^{6e} ; H; 할로겐; 및 C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-6} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환되며, 단, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 하나는 R^{6e} 이다. 더욱 바람직하게는, R^6 , R^{6a} , R^{6b} , R^{6c} , R^{6d} 중 하나는 R^{6e} 이고 나머지 중 2개 이하 (더욱 바람직하게는 1개, 훨씬 더욱 바람직하게는 어느 것도 아님)는 H가 아니다.

[0098] 바람직하게는, R^7 , R^{11a} , R^{11b} , R^{11c} 는 독립적으로 H; 및 C_{1-4} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 C_{1-4} 알킬은 동일하거나 상이한 하나 이상의 할로겐으로 임의로 치환된다.

[0099] 바람직하게는, R^{6a} 는 R^{6e} 이다.

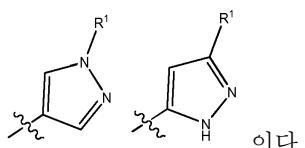
[0100] 바람직하게는, R^{6e} 는 $NHC(O)CH=CH_2$; $NHC(O)C(CH_3)=CH_2$; $NHC(O)CH=C(CH_3)_2$; $NHS(O)_2CH=CH_2$; 또는 $NHC(O)C\equiv CH$ 이다.

[0101] 바람직하게는, 고리 A는 피라졸, 옥사졸, 이속사졸, 트리아졸, 페닐, 또는 피리딜 고리이다. 더욱 바람직하게는, 고리 A는 피라졸릴 고리이고; 훨씬 더욱 바람직하게는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 고리이다:



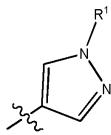
[0102]

[0103] 훨씬 더욱 바람직하게는



[0104]

[0105] 훨씬 더욱 바람직하게는



[0106]

바람직하게는, 0, 1, 또는 2개 (더욱 바람직하게는 0 또는 1개, 훨씬 더욱 바람직하게는 1개)의 R^1 (동일하거나 상이함)은 H가 아니다.

[0107]

바람직하게는, R^1 은 1 또는 2개의 R^3 (동일하거나 상이함)으로 임의로 치환되는 C_{1-4} 알킬이다. 바람직하게는,

R^1 은 비치환 C_{1-4} 알킬이다.

[0108]

바람직하게는, R^3 은 할로겐; CN; OR⁴; C(O)N(R⁴R^{4a}); 또는 C(O)T¹이다.

[0109]

상기 언급된 기의 일부 또는 전부가 바람직한 의미를 갖는 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 목적이다.

[0110]

본 발명의 추가의 바람직한 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0111]

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;

[0112]

N-(2-플루오로-5-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;

[0113]

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)프로페올아미드;

[0114]

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)에텐술폰아미드;

[0115]

N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)페닐)메타크릴아미드;

- [0116] 3-메틸-N-(3-((6-((1-메틸-1H-파라졸-4-일)아미노)-1H-파라졸로[3,4-d]파리미딘-1-일)메틸)페닐)부트-2-엔아미드;
- [0117] N-(3-((2-((1-메틸-1H-파라졸-4-일)아미노)-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-7-일)메틸)페닐)에텐술폰아미드;
- [0118] N-(3-((6-((1-메틸-1H-파라졸-3-일)아미노)-1H-파라졸로[4,3-c]파리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드;
- [0119] N-(3-((2-((1-메틸-1H-파라졸-4-일)아미노)-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-7-일)메틸)페닐)아크릴아미드; 및
- [0120] N-(3-((6-((1-메틸-1H-파라졸-4-일)아미노)-1H-파라졸로[4,3-c]파리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드.
- [0121] 화학식 I의 화합물의 호변이성질체화, 예를 들어 케토-에놀 호변이성질체화가 일어날 수 있는 경우, 개개의 형태, 예를 들어 케토 및 에놀 형태는 별도로 및 함께 임의의 비율의 혼합물로서 구성된다. 입체이성질체, 예를 들어 거울상이성질체, 시스/트랜스 이성질체, 형태이성질체 등에도 동일하게 적용된다.
- [0122] 화학식 I의 동위원소 표지된 화합물 ("동위원소 유도체")은 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 동위원소 표지화에 관한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 동위원소는 원소 H, C, N, O 및 S의 것이다.
- [0123] 필요에 따라, 이성질체는 당업계에 주지된 방법, 예를 들어 액체 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다. 거울상이성질체에 대해 예를 들어 키랄 정지상을 사용함으로써 동일하게 적용된다. 게다가, 거울상이성질체는 이들을 부분입체이성질체로 전환시킴으로써, 즉 거울상이성질체적으로 순수한 보조 화합물과 커플링 후, 생성된 부분입체이성질체의 분리 및 보조 잔기의 절단에 의해 단리할 수 있다. 별법으로, 화학식 I의 화합물의 임의의 거울상이성질체는 광학적으로 순수한 출발 물질을 사용하여 입체선택적 합성으로부터 수득할 수 있다.
- [0124] 화학식 I의 화합물은 결정질 또는 무정형 형태로 존재할 수 있다. 더욱이, 화학식 I의 화합물의 결정질 형태 중 일부는 다형체로서 존재할 수 있으며, 이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 화학식 I의 화합물의 다형체 형태는 X-선 분말 회절 (XRPD) 패턴, 적외선(IR) 스펙트럼, 라マン 스펙트럼, 시차 주사 열량계 (DSC), 열중량 분석 (TGA) 및 고체 상태 핵 자기 공명 (ssNMR)을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 다수의 종래 분석 기법을 사용하여 특성화 및 구별될 수 있다.
- [0125] 화학식 I에 따른 화합물이 하나 이상의 산성 또는 염기성 기를 함유하는 경우에, 본 발명은 또한 그의 상응하는 제약상 또는 독물학상 허용되는 염, 특히 그의 제약상 이용가능한 염을 포함한다. 따라서, 산성기를 함유하는 화학식 I의 화합물은 예를 들어 알칼리 금속 염, 알칼리 토금속 염으로 또는 암모늄 염으로서 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 이러한 염의 더욱 정확한 예로는, 나트륨 염, 칼륨 염, 칼슘 염, 마그네슘 염, 또는 암모니아 또는 유기 아민, 예컨대 에틸아민, 에탄올아민, 트리에탄올아민 또는 아미노산과의 염이 포함된다. 하나 이상의 염기성 기, 즉 양성자화될 수 있는 기를 함유하는 화학식 I의 화합물이 존재할 수 있으며 본 발명에 따라 무기 또는 유기 산과의 그의 부가염의 형태로 사용될 수 있다. 적합한 산의 예로는, 염화수소, 브로민화수소, 인산, 황산, 질산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 나프탈렌디술폰산, 옥살산, 아세트산, 타르타르산, 락트산, 살리실산, 벤조산, 포름산, 프로피온산, 피발산, 디에틸아세트산, 말론산, 숙신산, 피멜산, 푸마르산, 말레산, 말산, 술파민산, 페닐프로피온산, 글루콘산, 아스코르브산, 이소니코린산, 시트르산, 아디프산, 및 당업자에게 공지된 다른 산이 포함된다. 화학식 I의 화합물이 분자에 산성 및 염기성 기를 동시에 포함하는 경우, 본 발명은 또한, 언급한 염 형태 이외에도, 내부 염 또는 베타인 (쯔비티이온)도 포함한다. 화학식 I에 따른 각각의 염은 당업자에게 공지된 통상의 방법, 예를 들어 이들을 용매 또는 분산제 중에서 유기 또는 무기 산 또는 염기와 접촉시키거나, 기타 염으로 음이온 교환 또는 양이온 교환함으로써 수득할 수 있다. 본 발명은 또한, 낮은 생리적 적합성으로 인해 그대로 제약에 사용하기에 적합하지는 않지만, 예를 들어 화학 반응 또는 제약상 허용되는 염의 제조를 위한 중간체로서 사용될 수 있는 화학식 I의 화합물의 모든 염을 포함한다.
- [0126] 본 발명에 걸쳐, 용어 "제약상 허용되는"은, 해당 화합물, 담체 또는 분자가 인간에게 투여하기에 적합함을 의미한다. 바람직하게는, 이 용어는 동물, 바람직하게는 인간에 사용하기 위해 규제 기관, 예컨대 EMEA (유럽) 및/또는 FDA (US) 및/또는 기타 국가 규제 기관에서 승인된 것을 의미한다.
- [0127] 본 발명은 더욱이 본 발명에 따른 화합물의 모든 용매화물을 포함한다
- [0128] 본 발명에 따르면, "JAK"는 JAK 패밀리의 모든 구성원 (예를 들어, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2)를 포함한다.
- [0129] 본 발명에 따르면, 표현 "JAK1" 또는 "JAK1 키나제"는 "야누스 키나제 1"을 의미한다.
- [0130] 본 발명에 따르면, 표현 "JAK2" 또는 "JAK2 키나제"는 "야누스 키나제 2"를 의미한다.

- [0131] 본 발명에 따르면, 표현 "JAK3" 또는 "JAK3 키나제"는 "야누스 키나제 3"를 의미한다. JAK3을 코딩하는 유전자는 인간 염색체 19p13.1에 위치하고 주로 조혈 세포에 존재한다. JAK3은 인터류킨 2 (IL-2) 수용체의 감마-쇄와 연관되는 세포질 단백질 티로신 키나제이다. 이 쇄는 또한 인터류킨 IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21을 비롯한 몇몇 림프영양성 시토카인의 수용체에 대한 구성요소로서 작용한다 (문헌 [Schindler et al., 2007. J. Biol. Chem. 282(28):20059-63]). JAK3은 특히 비만 세포, 림프구 및 대식세포에서의 시토카인에 대한 면역세포의 반응에 핵심적인 역할을 한다. JAK3의 억제는 이식 거부의 예방에서 유익한 효과를 나타냈다 (문헌 [Changelian et al., 2003, Science 302(5646):875-888]).
- [0132] 게다가, 본 발명에 따르면, 표현 "JAK3" 또는 "JAK3 키나제"는 JAK3의 돌연변형, 바람직하게는 급성 거대핵모세포성 백혈병 (AMKL) 환자에서 발견된 JAK3 돌연변이체를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 이들 돌연변이체는 단일 아미노산 돌연변이이다. JAK3 돌연변이 활성화는 급성 거대핵모세포성 백혈병 (AMKL) 환자에서 관찰되었다 (문헌 [Walters et al., 2006. Cancer Cell 10(1):65-75]). 따라서, 바람직한 실시양태에서, 표현 "JAK"는 또한 V7221 또는 P132T 돌연변이를 갖는 JAK3 단백질을 포함한다.
- [0133] 본 발명에 따르면, 표현 "TYK2" 또는 "TYK2 키나제"는 "단백질-티로신 키나제 2"를 의미한다.
- [0134] 본 발명에 따르면, 표현 "BTK"는 "브루톤(Bruton's) 티로신 키나제"를 의미한다.
- [0135] 본 발명에 따르면, 표현 "BLK"는 "B-림프구 특이적 키나제"를 의미한다.
- [0136] 본 발명에 따르면, 표현 "ITK"는 "인터류킨-2 (IL-2)-유도성 T-세포 키나제"를 의미한다.
- [0137] 본 발명에 따르면, 표현 "TEC"는 "TEC 키나제"를 의미한다.
- [0138] 실시예에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물을 그의 효능, 선택성, 유효성 및 작용 방식에 대해 시험하였다. JAK 패밀리 내에서, 모든 시험된 화합물은 JAK1, JAK2 및 TYK2보다 더욱 강력하게 JAK3에 결합한다 (표 6 참조).
- [0139] 본 발명의 화합물은 BTK, BLK, ITK 및 TEC에 강력하게 결합하고 (표 8 참조) 키나제 기능을 억제한다 (표 10 참조). 세포의 워시아웃(washout) 연구에서 공유 억제제일 것으로 기대되는 본 발명의 화합물은 4시간까지의 동안 오래 지속되는 약리 작용을 나타내며, 한편 2개의 참조 억제제는 훨씬 짧은 활성을 나타내는 것으로 실증되었다 (표 12 참조). 게다가, 질량 분광 분석에 의해 실시예 1은 JAK3의 시스테인 잔기 909 (Cys909)와 공유 결합하는 것으로 실증되었다 (표 15 참조).
- [0140] 그 결과, 본 발명의 화합물은 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애, 예를 들어 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애, 이식 거부, 이식편대숙주병 또는 증식성 질환, 예컨대 암의 예방 또는 치료에 유용한 것으로 여겨진다.
- [0141] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 선택적인 JAK3 억제제이다.
- [0142] 본 발명은 활성 성분으로서 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 담체와 함께, 임의로 하나 이상의 다른 제약 조성물과 조합하여 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0143] "제약 조성물"은 하나 이상의 활성 성분, 및 담체를 구성하는 하나 이상의 불활성 성분뿐만 아니라, 임의의 둘 이상의 성분의 조합, 복합화 또는 집합, 또는 하나 이상의 성분의 해리, 또는 하나 이상의 성분의 다른 유형의 반응 또는 상호작용에 의해 직접 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 의미한다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 화합물과 제약상 허용되는 담체를 혼합함으로써 제조되는 임의의 조성물을 포함한다.
- [0144] 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 제약 담체는 멸균액, 예컨대 물 또는 오일일 수 있으며, 여기에는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것이 포함되는데, 이에는 땅콩유, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 물은 제약 조성물이 경구 투여되는 경우에 바람직한 담체이다. 식염수 및 수성 텍스트로스는 제약 조성물이 정맥내 투여되는 경우에 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 바람직하게는 주사액용 액체 담체로서 사용된다. 적합한 제약 부형제로는, 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 젤, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지 분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등이 포함된다. 필요에 따라, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 혼탁액, 유액, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방성 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 결합제 및 담체, 예컨대 트리글리세리드와 함께 조제될 수

있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다. 적합한 제약 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 환자로의 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록, 바람직하게는 정제된 형태로, 치료 유효량의 치료제를 적합한 양의 담체와 함께 함유할 것이다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다.

[0145] 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 화학식 I의 화합물과 같은 활성 성분으로서 하나 이상의 추가적 화합물을 포함할 수 있고 이는 조성물 또는 다른 JAK 억제제에서 제1 화합물이 아니다. 추가의 생물활성 화합물은 스테로이드, 류코트리엔 길항제, 시클로스포린 또는 라파마이신일 수 있다.

[0146] 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염(들) 및 기타 제약 활성제(들)는 함께 또는 별도로 투여할 수 있으며, 별도로 투여하는 경우, 이는 별도로 또는 임의의 순서로 순차적으로 할 수 있다. 동일 제제에 조합되는 경우, 두 화합물은 안정하고 서로 및 제제의 다른 성분들과 상용성을 가져야만 한다는 점을 이해할 것이다. 별도로 조제하는 경우, 이들은 편리하게는 당업계에 이러한 화합물에 대해 공지된 바와 같은 방식으로 임의의 편리한 제제로 제공될 수 있다.

[0147] 화학식 I의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물을 또 다른 약물 또는 제약 활성제와 조합하여 투여하는 것 및/또는 본 발명의 제약 조성물이 이러한 약물 또는 제약 활성제를 추가로 포함하는 것이 본 발명에 추가로 포함된다.

[0148] 이러한 맥락에서, 용어 "약물 또는 제약 활성제"는 예를 들어 연구원 또는 임상학자가 탐구하는 조직, 계, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어 낼 약물 또는 약제를 포함한다.

[0149] "조합된" 또는 "조합하여" 또는 "조합"은 기능적 병용투여로서 이해되어야 하며, 여기서 일부 또는 모든 화합물을 별도로, 상이한 제제로, 상이한 투여 방식으로 (예컨대 피하, 정맥내 또는 경구) 및 상이한 투여 시간으로 투여될 수 있다. 이러한 조합물의 개개의 화합물은 별도의 제약 조성물로 순차적으로뿐만 아니라 조합된 제약 조성물로 동시에 투여될 수 있다.

[0150] 예를 들어, 류마티스성 관절염 치료에서, 다른 화학치료제 또는 항체 제제와의 조합이 고려된다. 류마티스성 관절염 치료를 위해 본 발명의 화합물 및 그의 염과 조합하여 사용될 수 있는 제약 활성제의 적합한 예로는 다음이 포함된다: 면역억제제, 예컨대 암톨메틴 구아실, 미조리빈 및 리벡솔론; 항-TNF α 제제, 예컨대 에타네르셉트, 인플릭시마브, 아달리무마브, 아나킨라, 아바타셉트, 리툭시마브; 티로신 키나제 억제제, 예컨대 레플루노미드; 칼리크레인 길항제, 예컨대 수브레움; 인터류킨 11 효능제, 예컨대 오프렐베킨; 인터페론 베타 1 효능제; 히알루론산 효능제, 예컨대 NRD-101 (아벤티스(Aventis)); 인터류킨 1 수용체 길항제, 예컨대 아나킨라; CD8 길항제, 예컨대 아미프릴로스 히드로클로라이드; 베타 아밀로이드 전구체 단백질 길항제, 예컨대 류마콘; 기질 금속단백질분해효소 억제제, 예컨대 시페마스타트 및 기타 질환 완화 항류마티스 약물 (DMARD), 예컨대 메토트렉세이트, 술파살라진, 시클로스포린 A, 히드록시콜로퀸, 아우라노핀, 아우로티오플루코스, 금 티오말산 나트륨 및 페니실라민.

[0151] 특히, 본원에 정의된 치료는 단독 치료로서 적용될 수 있거나, 본 발명의 화합물 이외에도, 종래의 수술 또는 방사선요법 또는 화학요법을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 또한 암과 같은 종식성 질환 치료용 기존 치료제와 조합하여 사용할 수 있다. 조합하여 사용되는 적합한 작용제는 다음을 포함한다:

[0152] (i) 의학 종양학에서 사용되는 바와 같은, 항증식/항신생물 약물 및 그의 조합물, 예컨대 알킬화제 (예를 들어, 시스-플라틴, 카르보플라틴, 시클로포스파미드, 질소 머스터드, 멜팔란, 클로람부실, 부술판 및 니트로소우레아); 항대사물질 (예를 들어, 항엽산제, 예컨대 플루오로피리미딘, 예컨대 5-플루오로우라실 및 테가푸르, 란티트렉세드, 메토트렉세이트, 시토신 아라비노시드, 히드록시우레아 및 쟈시타빈); 항종양 항생제 (예를 들어, 안트라시클린, 예컨대 아드리아마이신, 블레오마이신, 독소루비신, 다우노마이신, 에피루비신, 이다루비신, 미토마이신-C, 닥티노마이신 및 미트라마이신); 항유사분열제 (예를 들어, 빈카 알카로이드, 예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈 및 탁소이드, 예컨대 파클리탁셀 및 탁소테레); 및 토포이소머라아제 억제제 (예를 들어, 에피포도필로토신, 예컨대 에토포시드 및 테니포시드, 암사크린, 토포테칸 및 캄토테신);

[0153] (ii) 세포증식억제제, 예컨대 항에스트로겐제 (예를 들어, 타목시펜, 토레미펜, 랄록시펜, 드롤록시펜 및 아이오독시펜), 에스트로겐 수용체 다운 조절자(down regulator) (예를 들어, 풀베스트란트), 항안드로겐제 (예를 들어, 비칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드 및 시프로테론 아세테이트), LHRH 길항제 또는 LHRH 효능제 (예를

들어, 고세렐린, 류프로렐린 및 부세렐린), 프로게스토겐제 (예를 들어, 메게스트를 아세테이트), 아로마타제 억제제 (예를 들어, 아나스트로졸, 레트로졸, 보라졸 및 액세메스탄) 및 5α-환원효소의 억제제, 예컨대 피나스테리드;

[0154] (iii) 항-침습제 (예를 들어, c-Src 키나제 패밀리 억제제, 예컨대 4-(6-클로로-2,3-메틸렌디옥시아닐리노)-7-[2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시]-5-테트라하이드로피란-4-일옥시-퀴나졸린 (AZD0530) 및 N-(2-클로로-6-메틸페닐)-2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]-2-메틸피리미딘-4-일아미노}티아졸-5-카르복사미드 (다사티니브, BMS-354825), 및 금속단백질분해효소 억제제, 예컨대 마리마스타트 및 우로키나제 플라스미노겐 활성체 수용체 기능의 억제제);

[0155] (iv) 성장 인자 기능의 억제제: 예를 들어 이러한 억제제로는 성장 인자 항체 및 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 항-erbB2 항체 트라스투주마브 [헤르셉틴(Herceptin)TM] 및 항-erbB1 항체 세툭시마브 [C225])가 포함되고; 이러한 억제제로는 또한 예를 들어 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 표피 성장 인자 패밀리의 억제제 (예를 들어, EGFR 패밀리 티로신 키나제 억제제, 예컨대 N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-메톡시-6-(3-모르폴리노프로포시)퀴나졸린-4-아민 (게피티니브, ZD 1839), N-(3-에티닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시)퀴나졸린-4-아민 (에톨로티니브, OSI-774) 및 6-아크릴아미도-N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-(3-모르폴리노프로포시)-퀴나졸린-4-아민 (CI 1033) 및 erbB2 티로신 키나제 억제제, 예컨대 라파티니브), 간세포 성장 인자 패밀리의 억제제, 혈소판-유래 성장 인자 패밀리의 억제제, 예컨대 이마티니브, 세린/트레오닌 키나제의 억제제 (예를 들어, Ras/Raf 신호전달 억제제, 예컨대 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 예를 들어 소라페니브 (BAY 43-9006)) 및 MEK 및/또는 Akt 키나제를 통한 세포 신호전달의 억제제가 포함되고;

[0156] (v) 항혈관형성제, 예컨대 혈관 내피 세포 성장 인자의 효과를 억제하는 것, 예를 들어 항-혈관 내피 세포 성장 인자 항체 베마시주마브 (아바스틴(Avastin)TM) 및 VEGF 수용체 티로신 키나제 억제제, 예컨대 4-(4-브로모-2-플루오로아닐리노)-6-메톡시-7-(1-메틸피페리딘-4-일메톡시)퀴나졸린 (ZD6474; WO 01/32651에서 실시예 2), 4-(4-플루오로-2-메틸인돌-5-일옥시)-6-메톡시-7-(3-피롤리딘-1-일프로포시)퀴나졸린 (AZD2171; WO 00/47212에서 실시예 240), 바탈라니브 (PTK787; WO 98/35985) 및 SU1 1248 (수니티니브; WO 01/60814), 및 다른 메커니즘에 의해 작용하는 화합물 (예를 들어, 리노미드, 인테그린 α v β 3 기능의 억제제 및 안지오스타틴);

[0157] (vi) 혈관 손상제, 예컨대 콤브레타스타틴 A4 및 국제특허출원 WO 99/02166에 개시된 화합물;

[0158] (vii) 안티센스 치료제, 예컨대 상기 기재된 표적을 지향하는 것들, 예컨대 ISIS 2503, 항-ras 안티센스제;

[0159] (viii) 이상(aberrant) 유전자, 예컨대 이상 p53 또는 이상 BRCA1 또는 BRCA2를 대체하는 접근법, GDEPT (유전자-지향 효소 프로드러그 치료) 접근법, 예컨대 시토신 데아미나제, 티미딘 키나제 또는 세균성 니트로리덕타제 효소를 사용하는 것들 및 화학요법 또는 방사선요법에 내성인 환자를 증가시키는 접근법, 예컨대 다제 내성 유전자 치료를 비롯한, 유전자 치료 접근법; 및

[0160] (ix) 환자 종양 세포의 면역원성을 증가시키는 생체외 및 생체내 접근법, 예컨대 시토카인, 예컨대 인터류킨 2, 인터류킨 4 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자에 의한 형질감염, T-세포 아네르기를 감소시키는 접근법, 형질감염된 면역 세포, 예컨대 시토카인-형질감염된 수상돌기를 사용한 접근법, 시토카인-형질감염된 종양 세포 주를 사용한 접근법 및 항-유전자형 항체를 사용한 접근법을 비롯한, 면역요법 접근법.

[0161] 추가의 조합 치료는 WO-A 2009/008992 및 WO-A 2007/107318에 기재되어 있으며, 이들은 본원에 참조로 포함된다.

[0162] 따라서, 이러한 조합물의 개개의 화합물은 별도의 제약 조성물로 순차적으로뿐만 아니라 조합된 제약 조성물로 동시에 투여할 수 있다.

[0163] 본 발명의 제약 조성물은 경구, 직장, 국소, 비경구 (피하, 근육내, 및 정맥내 포함), 안구 (눈), 폐 (비강 또는 구강 흡입), 또는 비강 투여에 적합한 조성물을 포함하지만, 임의의 주어진 경우에서 가장 적합한 경로는 치료할 병태의 본질 및 중증도 및 활성 성분의 본질에 좌우될 것이다. 이들은 편의상 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 제약 분야에 주지된 방법 중 임의의 방법으로 제조할 수 있다.

[0164] 실용상, 화학식 I의 화합물은 통상적인 제약 배합 기법에 따라 제약 담체와 친밀 혼합하여 활성 성분으로서 조합될 수 있다. 담체는, 예를 들어 경구 또는 비경구 (정맥내 포함) 투여에 바람직한 제제 형태에 따라 다종 다양한 형태를 취할 수 있다. 경구 투여 형태용 조성물의 제조에서, 임의의 통상적 제약 매질, 예컨대, 경구 액상 제제, 예를 들어 혼탁액, 엘릭세르 및 액제 등의 경우에 물, 글리콜, 오일, 알콜, 향미제, 보존제, 착색제

등; 또는 경구 고체 제제, 예컨대 분말, 경질 및 연질 캡슐 및 정제의 경우에 담체, 예컨대 전분, 당, 미세결정질 셀룰로스, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 봉해제 등을 사용할 수 있으며, 여기서 고체 경구 제제가 액상 제제에 비해 바람직하다.

[0165] 정제 및 캡슐은, 이들의 투여 용이성 때문에, 가장 유리한 경구 투여 단위 형태를 대표하며, 이 경우에 고체 제약 담체가 분명히 사용된다. 필요한 경우, 정제는 표준 수성 또는 비수성 기법에 의해 코팅될 수 있다. 이러한 조성물 및 제제는 적어도 0.1 퍼센트의 활성 화합물을 함유하여야 한다. 이들 조성물 내 활성 화합물의 백분율은 물론 다양할 수 있고, 편의상 단위의 약 2 퍼센트 내지 약 60 퍼센트 중량일 수 있다. 이러한 치료상 유용한 조성물 내 활성 화합물의 양은 효과적인 투여가 수득되도록 하는 양이다. 활성 화합물은 또한 비강 내, 예를 들어 액적 또는 스프레이로서 투여될 수도 있다.

[0166] 정제, 환제, 캡슐 등은 또한 결합제, 예컨대 트라가칸트, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 인산2칼슘; 봉해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예컨대 수크로스, 락토스 또는 사카린을 함유할 수 있다. 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 유형의 물질 이외에도 액체 담체, 예컨대 지방 오일을 함유할 수 있다.

[0167] 다양한 기타 물질을 코팅물로서 또는 투여 단위의 물리적 형태를 변형하도록 존재시킬 수 있다. 예를 들어, 정제는 셀락, 당 또는 이를 둘 다로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 활성 성분 이외에도 수크로스를 감미제로서, 메틸 및 프로필파라벤을 보존제로서, 염료 및 향미제, 예컨대 체리 또는 오렌지 향을 함유할 수 있다.

[0168] 화학식 I의 화합물은 또한 비경구 투여될 수 있다. 이들 활성 화합물의 용액 또는 혼탁액은 계면활성제, 예컨대 히드록시프로필-셀룰로스와 적합하게 혼합하여 수중에서 제조할 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 그의 혼합물로 오일 중에서 제조될 수 있다. 보관 및 사용의 통상의 조건하에, 이들 제제는 미생물 성장을 방지하기 위해 보존제를 함유한다.

[0169] 주사용에 적합한 제약 형태는 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 상기 형태는 멸균이어야 하며 용이하게 주사가능할 정도로 유동성이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건하에 안정하여야 하며, 미생물, 예컨대 세균 및 진균의 오염 작용으로부터 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 그의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0170] 포유동물, 특히 인간에게 유효 용량의 본 발명의 화합물을 제공하기 위해 임의의 적합한 투여 경로를 사용할 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 국소, 비경구, 안구, 폐, 비강 등이 사용될 수 있다. 투여 형태로는 정제, 트로키, 분산액, 혼탁액, 용액, 캡슐, 크림, 연고, 에어로졸 등이 포함된다. 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 경구 투여된다.

[0171] 사용되는 활성 성분의 유효 투여량은 사용되는 특정 화합물, 투여 방식, 치료할 병태 및 치료할 병태의 중증도에 따라 달라질 것이다. 당업자는 이러한 투여량을 용이하게 확인할 수 있다.

[0172] 본 발명의 화합물의 치료 유효량은 통상, 예를 들어 동물의 연령 및 체중, 치료를 요하는 정확한 병태 및 그의 중증도, 제제의 본질, 및 투여 경로를 비롯한 다수의 인자에 따라 좌우될 것이다. 그러나, 염증 질환, 예컨대 류마티스성 관절염 (RA)의 치료를 위한 화학식 I의 화합물의 유효량은 일반적으로 수용자 (포유동물)의 체중 1 kg당 1일 0.1 내지 100 mg의 범위, 더욱 통상적으로 1일 체중 1 kg당 1 내지 10 mg의 범위일 것이다. 따라서, 70 kg의 성체 포유동물의 경우, 1일 실제량은 통상 70 내지 700 mg일 것이고, 이 양은 1일 단일 용량으로 제공되거나, 더욱 통상적으로 총 1일 용량이 동일하도록 하여 1일 다수회 (예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 6회)의 하위 용량으로 제공될 수 있다. 그의 제약상 허용되는 염, 프로드러그 또는 대사산물의 유효량은 화학식 I의 화합물 자체의 유효량의 분율로서 결정될 수 있다. 유사한 투여량이 상기에 언급된 기타 병태의 치료에 적절할 것으로 예상된다.

[0173] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량"은 예를 들어 연구원 또는 임상학자가 탐구하는 조직, 계, 동물 또는 인간의 생리학적 또는 의학적 반응을 이끌어 낼 약물 또는 약제의 양을 의미한다.

[0174] 더욱이, 용어 "치료 유효량"은 이러한 양을 받지 않은 상응하는 대상체와 비교하여 질환, 장애, 또는 부작용의 개선된 치료, 치유, 예방 또는 개선, 또는 질환 또는 장애의 진행 속도를 저감시키는 결과를 가져오는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어는 또한 통상의 생리적 기능을 향상시키는데 효과적인 양을 그 범주 내에 포함한다.

[0175] 본 발명의 또 다른 측면은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.

- [0176] 본 발명의 또 다른 측면은 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.
- [0177] 본 발명의 맥락에서, JAK3, BTK, BLK, ITK 및 TEC와 연관된 질환 또는 장애는 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC가 연루되어 있는 질환 또는 장애로서 정의된다.
- [0178] 바람직한 실시양태에서, JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 또는 장애는 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병이다.
- [0179] 그 결과, 본 발명의 또 다른 측면은 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.
- [0180] 조직 및 기관의 염증은 광범위한 장애 및 질환에서 발생되며, 특정 변형에서는 시토카인 패밀리의 수용체의 활성화가 원인이다. JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC의 활성화와 연관된 예시적 염증 장애로는, 비제한적으로, 방사선 노출로 인한 피부 염증, 천식, 알레르기성 염증 및 만성 염증이 포함된다.
- [0181] 본 발명에 따르면, 자가면역 질환은 고유의 구성성분, 예를 들어 단백질, 지질 또는 DNA에 대한 신체의 면역 반응에 의해 적어도 일부 유발되는 질환이다. 기관-특이적 자가면역 장애의 예는 혀장에 영향을 미치는 인슐린-의존성 당뇨병(I형), 갑상선에 영향을 미치는 하시모토 갑상선염 및 그레이브스병, 위에 영향을 미치는 악성 빈혈, 부신에 영향을 미치는 쿠싱병 및 에디슨병, 간에 영향을 미치는 만성 활성 간염; 다낭성 난소 증후군(PCOS), 셀리악병, 건선, 염증성 장 질환(IBD) 및 강직성 척추염이다. 비-기관-특이적 자가면역 장애의 예는 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 전신 루푸스 및 중증 근무력증이다.
- [0182] I형 당뇨병은 랑게르ハン스섬의 인슐린 분비 베타-세포에 대한 자가반응성 T-세포의 선택적인 공격이 원인이다. 이러한 질환에서의 JAK3 표적화는 JAK 경로를 통해 신호전달하는 다중 시토카인이 베타-세포의 T-세포 매개된 자가면역 과정에 관여하는 것으로 공지된 관찰을 기반으로 한다. 실제로, JAK3 억제제, JANEX-1은 I형 당뇨병의 NOD 마우스 모델에서 자가면역 당뇨병 발증을 예방하는 것으로 나타났다.
- [0183] 바람직한 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스성 관절염(RA), 염증성 장 질환(IBD; 크론병 및 궤양성 대장염), 건선, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 및 다발성 경화증(MS)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0184] 류마티스성 관절염(RA)은 전세계 인구의 대략 1%에 발병하는 만성 진행성 쇠약성 염증 질환이다. RA는 손 및 발의 소관절에 주로 영향을 미치는 대칭성 다관절 관절염이다. 활액막내 염증 이외에도, 관절 라이닝인 판누스라 불리는 공격성 프론트(front)가 국소 관절 구조를 침습하고 파괴한다 (문헌 [Firestein 2003, Nature 423:356-361]).
- [0185] 염증성 장 질환(IBD)은 만성 재발성 장 염증을 특징으로 한다. IBD는 크론병과 궤양성 대장염 표현형으로 나누어진다. 크론병은 가장 빈번하게 말단 회장 및 결장에 관여하며, 벽경유이고 비연속적이다. 그에 반해서, 궤양성 대장염에서는, 염증이 연속적이며 직장 및 결장 점막층에 한정된다. 직장 및 결장에 국한된 경우 중 대략 10%에 있어서, 크론병 또는 궤양성 대장염을 한정적으로 분류할 수 없으며 '불확정 대장염'이라 한다. 양 질환은 피부, 눈, 또는 관절의 장외 염증을 포함한다. 호중구-유발 손상은 호중구 이동 억제제의 사용에 의해 예방될 수 있다 (문헌 [Asakura et al., 2007, World J Gastroenterol. 13(15):2145-9]).
- [0186] 건선은 인구의 대략 2%에 발병하는 만성 염증성 피부염이다. 이는 두피, 팔꿈치, 및 무릎에서 통상 발견되는 붉은 비닐모양의 피부 패치를 특징으로 하며 중증 관절염과 연관이 있을 수 있다. 병소는 비정상 케라틴세포 증식 및 염증 세포의 진피 및 표피로의 침입에 의해 야기된다 (문헌 [Schoen et al., 2005, New Engl. J. Med. 352:1899-1912]).
- [0187] 전신성 홍반성 낭창(SLE)은 T-세포 매개된 B-세포 활성화에 의해 발생된 만성 염증 질환으로서, 그 결과 사구체 신염 및 신부전이 초래된다. 인간 SLE는 초기 단계에서 오래 지속되는 자가반응성 CD4+ 기억 세포의 팽창을 특징으로 한다 (문헌 [D'Cruz et al., 2007, Lancet 369(9561):587-596]).
- [0188] 다발성 경화증 (MS)은 염증성 및 탈수초 신경 질환이다. 이는 CD4+ 타입 1 T 헬퍼 세포에 의해 매개된 자가면역 장애로서 여겨져 왔으나, 최근의 연구에서 다른 면역 세포의 역할이 지적되었다 (문헌 [Hemmer et al., 2002, Nat. Rev. Neuroscience 3, 291-301]).
- [0189] 바람직한 실시양태에서, 알레르기성 질환은 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD), 성인 호흡 곤란 증후군 (ARDS),

기관지염, 결막염, 피부염 및 알레르기성 비염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0190] 비만 세포는 JAK3을 발현하고, JAK3은 염증 매개자의 방출을 비롯한 IgE 매개된 비만 세포 반응의 핵심적인 조절자이다. JAK3은 비만 세포 매개된 알레르기성 반응의 치료에 있어서 유효한 표적으로 나타났다. 비만 세포 활성화와 연관된 알레르기성 장애는 타입 I 즉시 과민 반응, 예컨대 알레르기성 비염 (고초열), 알레르기성 두드러기(urticaria) (두드러기(hive)), 혈관부종, 알레르기성 천식 및 아나필락시스, 예를 들어 아나필라티크 쇼크를 포함한다. 이들 장애는 JAK3 활성의 억제에 의해, 예를 들어 본 발명에 따른 JAK3 억제제의 투여에 의해 치료 또는 예방될 수 있다.

[0191] 이식 거부 (동종이식편 이식 거부)는 제한되지 않지만, 예를 들어 신장, 심장, 간, 폐, 골수, 피부 및 각막의 이식에 따르는 급성 및 만성 동종이식편 거부를 포함한다. T 세포는 동종이식편 거부의 특이적 면역 반응에 있어서 중심적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 초급성, 급성 및 만성 기관 이식 거부가 치료될 수 있다. 초급성 거부는 이식 후 몇 분 내에 발생한다. 급성 거부는 일반적으로 이식 6 내지 12개월 내에 발생한다. 초급성 및 급성 거부는 면역억제제로 치료하는 경우 전형적으로는 가역적이다. 만성 거부는 기관 기능의 점진적 손실을 특징으로 하며, 이식 후 언제든지 일어날 수 있기 때문에 이식 수용자에 대해 지속적인 관심 대상이다.

[0192] 이식편대숙주병(GVHD)은 동종이식편 골수 이식 (BMT)에서의 주요 합병증이다. GVHD는 조직적합성 복합 시스템에서의 수용자 차이를 인식하고 이에 대해 반응하는 도너 T 세포에 의해 야기되며, 그 결과 상당한 질병률 및 사망률이 초래된다. JAK3은 GVHD의 유발에 있어 핵심적인 역할을 하며, JAK3 억제제, JANEX-1로의 치료는 GVHD의 심각성을 약화시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Cetkovic-Cvrlje and Ucken, 2004]에서 검토됨).

[0193] 천식은 성인 및 어린이 둘 다에서 많은 임상 표현형을 갖는 복합 증후군이다. 그의 주요 특징으로는 기류 폐쇄의 가변 정도, 기관지 과민반응성, 및 기도 염증이 포함된다 (문헌 [Busse and Lemanske, 2001, N. Engl. J. Med. 344:350-362]).

[0194] 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)은 염증, 완전히 가역적인 것은 아닌 기류 제한, 및 폐 기능의 점차적인 상실을 특징으로 한다. COPD에서, 자극원의 만성 흡입은 폐에서 비정상 염증 반응, 기도의 재형성(remodeling), 및 기류 제한을 야기한다. 흡입된 자극원은 통상 담배 연기이거나, 직업상 먼지 및 환경 오염이 가변적으로 연루된다 (문헌 [Shapiro 2005, N. Engl. J. med. 352, 2016-2019]).

[0195] 바람직한 실시양태에서, 염증 질환은 안 질환이다.

[0196] 안구 건조증 (DES, 건성 각결막염으로도 알려짐)은 안과의에 의해 치료되는 가장 흔한 문제 중 하나이다. 때때로, DES는 눈물 기능이상증으로 지칭된다 (문헌 [Jackson, 2009. Canadian Journal Ophthalmology 44(4), 385-394]). DES는 20 내지 45세 사이의 인구의 10%까지 발생하며, 이 백분율은 나이가 들수록 증가한다. 다종다양한 인공 눈물을 제품이 입수 가능하지만, 이들 제품은 증상의 단지 일시적인 완화를 제공한다. 이에, 건성안을 치료하는 작용제, 조성물 및 치료법이 요구되고 있다.

[0197] 본원에 사용된 바와 같이, "건성안 장애"는 건성안 워크샵(Dry Eye Workshop: DEWS)의 최근 공식적인 보고서에 요약되어 있는 질환 상태를 포함하는 것으로 의도되며, 여기서는 건성안을 "불편감, 시력 장애, 및 안구 표면에 잠재적인 손상을 주는 눈물막 불안정성의 증상이 초래되는 눈물 및 안구 표면의 다인성 질환. 이는 눈물막의 삼투압 증가 및 안구 표면의 염증에 의해 수반된다" 라고 정의하고 있다 (문헌 [Lemp, 2007. "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]). 건성안은 또한 때때로 건성 각결막염으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 건성안 장애의 치료는 건성안 장애의 특정 증상, 예컨대 안구 불편감, 시력 장애, 눈물막 불안정성, 눈물 고삼투압, 및 안구 표면의 염증의 개선을 포함한다.

[0198] 포도막염은 가장 흔한 형태의 안내 염증이고 시력 손실의 중요한 원인으로 남아 있다. 현재의 포도막염 치료는 심각한 부작용을 갖고 전체적으로 면역억제성인 전신 투약을 사용한다. 임상적으로, 만성 진행성 또는 재발 형태의 비전염성 포도막염은 국소 및/또는 전신 코르티코스테로이드로 치료된다. 또한, 마크롤라이드, 예컨대 시클로스포린 및 라파마이신이 사용되며, 일부 경우에 세포독성제, 예컨대 시클로포스파미드 및 클로람부실, 및 항대사물질, 예컨대 아자티오프린, 메토트렉세이트, 및 레플루노미드가 사용된다 (문헌 [Srivastava et al., 2010. Uveitis: Mechanisms and recent advances in therapy. Clinica Chimica Acta, doi:10.1016/j.cca.2010.04.017]).

[0199] 추가적 안 질환, 조합 치료 및 투여 경로는 예를 들어 WO-A 2010/039939에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참조

로 포함된다.

- [0200] 추가의 바람직한 실시양태에서, JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 또는 장애는 증식성 질환, 특히 암이다.
- [0201] JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 특히 연관된 질환 및 장애는 증식성 장애 또는 질환, 특히 암이다.
- [0202] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 증식성 질환, 특히 암의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.
- [0203] 암은 비정상 세포의 제어되지 않는 성장 및 확산을 특징으로 하는 질환군을 포함한다. 모든 유형의 암은 일반적으로 세포 성장, 분열 및 생존의 제어에서의 일부 비정상에 관여하며, 이로써 세포의 악성 성장이 초래된다. 세포의 상기 악성 성장에 원인이 되는 핵심 인자는 성장 신호로부터의 독립, 항-성장 신호에 대한 불감성, 아폽토시스의 회피, 무한 복제 잠재력, 지속적인 혈관생성, 조직 침습 및 전이, 및 계놈 불안정성이다 (문헌 [Hanahan and Weinberg, 2000. The Hallmarks of Cancer. Cell 100, 57-70]).
- [0204] 전형적으로, 암은 혈액암 (예를 들어, 백혈병 및 림프종) 및 고형암, 예컨대 육종 및 암종 (예를 들어 뇌, 유방, 폐, 결장, 위, 간, 췌장, 전립선, 난소의 암)으로 분류된다.
- [0205] 본 발명의 키나제 억제제는 또한 피부암 및 혈액 악성종양, 예컨대 임파종 및 백혈병을 비롯한 특정 악성종양의 치료에 유용할 수 있다.
- [0206] 특히 JAK-STAT 신호 전달 경로가, 예를 들어 JAK3의 활성화로 인해 활성화되는 암은 JAK3 억제제로의 치료에 반응하는 것으로 기대된다. JAK3 돌연변이를 포함하는 암의 예는 급성 거대핵모세포성 백혈병 (AMKL) (문헌 [Walters et al., 2006. Cancer Cell 10(1):65-75]) 및 유방암 (문헌 [Jeong et al., 2008. Clin. Cancer Res. 14,3716-3721])이다.
- [0207] 본 발명의 또 다른 측면은 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도이다.
- [0208] 본 발명의 또 다른 측면은 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도이다.
- [0209] 본 발명의 또 다른 측면은 증식성 질환, 특히 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도이다.
- [0210] 이러한 본 발명의 용도의 맥락에서, JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애는 상기에 정의된 바와 같다.
- [0211] 본 발명의 또 다른 측면은 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 병태의 치료, 제어, 지연 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 환자에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 상기 하나 이상의 병태를 치료, 제어, 지연 또는 예방하는 방법이다.
- [0212] 본 발명의 또 다른 측면은 면역학적, 염증성, 자가면역, 또는 알레르기성 장애 또는 질환 또는 이식 거부 또는 이식편대숙주병으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 병태의 치료, 제어, 지연 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 환자에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 상기 하나 이상의 병태를 치료, 제어, 지연 또는 예방하는 방법이다.
- [0213] 본 발명의 또 다른 측면은 증식성 질환, 특히 암의 치료, 제어, 지연 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 환자에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자에서 증식성 질환, 특히 암을 치료, 제어, 지연 또는 예방하는 방법이다.
- [0214] 본 발명의 이들 방법의 맥락에서, JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC와 연관된 질환 및 장애는 상기에 정의된 바와 같다.
- [0215] 본 발명의 이들 방법의 맥락에서, 본 발명의 화합물은 바람직하게는 JAK3, BTK, BLK, ITK 또는 TEC에, 바람직하게는 시스테인 잔기에 공유 결합한다.
- [0216] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 질환의 진행을 둔화, 중단, 저지, 또는 중지시키는

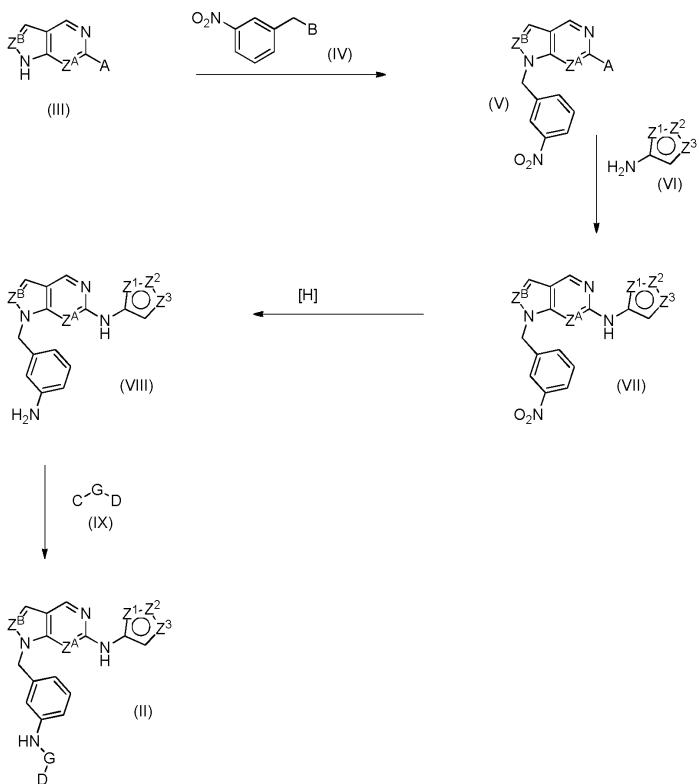
것일 수 있는 모든 과정을 지칭하는 것으로 의도되지만, 반드시 모든 중상의 완전한 제거를 나타내는 것은 아니다.

[0217] 본 발명의 제약 조성물과 관련하여 상기에 논의된 모든 실시양태는 또한 상기 언급된 본 발명의 제1 또는 제2 의학적 용도 또는 방법에 적용된다.

[0218] 본 발명의 화합물의 제조는 문헌, 예컨대 WO 2011/048082 A1에 기재되어 있다. 본 발명의 화합물의 제조의 예시적 경로는 이하에 기재되어 있다. 특히 활성화 또는 보호 화학기의 도입과 함께 이러한 경로를 조합하거나 조정하는 것은 당업자에게 자명하다.

[0219] 본 발명에 따른 화합물의 제조에 관한 예시적인 일반 경로는 반응식 1에 개략적으로 나타나 있다. 화합물 IV를 예시의 목적으로 사용한다. 당업자는 화합물 IV 대신에 유사한 시약을 사용하여 본원에 기재된 추가의 화합물을 합성할 수 있음을 인식할 것이다.

[0220] <반응식 1>



[0221]

[0222] 화학식 II의 화합물은, 시판되거나 당업자에 의해 제조될 수 있는 화합물 III, IV, VI 및 IX로부터 형성시킬 수 있다. 양성자 용매, 예컨대 알콜; 극성 비양성자성 용매, 예컨대 디메틸솔록시드, DMF, 아세토니트릴, 디옥산, THF; 무극성 용매, 예컨대 틀루엔, DCM; 또는 염기성 용매, 예컨대 피리딘을 포함한 광범위한 용매를 이들 반응에 임의로 사용한다. 아민 염기, 예컨대 트리에틸아민 및 DIPEA; 또는 금속 탄산염을 포함하지만 이에 제한되지 않는 염기를 첨가함으로써 반응을 임의로 촉진시킬 수 있다. 무기 산, 예컨대 염화수소; 유기 산 및 루이스 산을 포함한 산에 의해 반응을 임의로 촉진시킬 수 있다. A, B 및 C는 적합한 이탈기, 예컨대 할로겐이다. G는 SO_2 또는 $C(0)$ 이다. D는 임의로 치환된 알켄 또는 알린이다.

[0223]

당업자는 수행의 순서는 반응의 조건 및 시약의 본질에 따라 달라질 것이라는 것; 각각의 화합물에 대한 1개 초과의 경로가 가능할 수 있다는 것; 반응식 1에 구체화된 것에 대해 수행의 순서가 교대될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0224]

한 실시양태에서, 화학식 III의 화합물을 극성 비양자성 용매, 예컨대 아세토니트릴 중에서; 염기, 예컨대 탄산칼륨의 존재하에 화학식 IV의 화합물과 반응시켜 화학식 V의 화합물을 제공한다. 그 다음 이를 $20^{\circ}C$ 초과의 온도, 예컨대 $90^{\circ}C$ 에서; 양성자성 용매, 예컨대 이소프로판을 중에서; 산, 예컨대 염화수소의 존재하에 화학식 VI의 화합물과 반응시켜 화학식 VII의 화합물을 수득한다. 이를 비양성자성 용매, 예컨대 메탄올 중에서; 촉매, 예컨대 Pd/C의 존재하에; 환원제, 예컨대 수소와 반응시켜 화학식 VIII의 화합물을 수득한다. 그 다음 이를 무

극성 용매, 예컨대 DCM 중에서; 염기, 예컨대 DIPEA의 존재하에 화학식 IX의 화합물과 반응시켜 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0225] **도면의 간단한 설명**

도 1: 인간 JAK3 (IPIIPI00002773.4)의 아미노산 서열. 시스테인 잔기 909를 갖는 웹티드 LVMEYLPSGCLR (위치 900-911)에 밑줄이 그어져 있다.

[0227] **실시예**

[0228] **분석 방법**

[0229] NMR 스펙트럼을 브루커(Bruker) dpx400 상에서 수득하였다. LCMS를 제미니(Gemini) C18, 3 x 30 mm, 3 마이크로미터를 사용하여 아질런트(Agilent) 1100 상에서 수행하였다. 칼럼 유량은 1.2 mL/min이고 사용된 용매는 물 및 아세토니트릴 (0.1% 포름산 - 높은 pH, 0.1% 암모니아 - 낮은 pH)이었으며, 주입 부피는 3 μ L이었다. 파장은 254 및 210 nm이었다.

[0230] **방법 A**

[0231] 칼럼: 폐노메넥스(Phenomenex) 제미니-C18, 3 x 30 mm, 3 마이크로미터. 유량: 1.2 mL/min

표 1

시간(분)	물(%)	ACN(%)
0	95	5
3	5	95
4.5	5	95
4.6	95	5
5	중지	

[0232]

[0233] **방법 B**

[0234] 칼럼: 폐노메넥스 제미니-C18, 4.6 x 150 mm, 5 마이크로미터. 유량: 1.0 mL/min

표 2

시간(분)	물(%)	ACN(%)
0.00	95.0	5.0
11.00	5.0	95.0
13.00	5.0	95.0
13.01	95.0	5.0
14.00	중지	

[0235]

[0236] **방법 C**

[0237] 칼럼: 폐노메넥스 제미니-NX C18, 4.6 x 150 mm, 5 마이크로미터. 유량: 1 mL/min. 구배:

표 3

시간 (분)	물	아세토니트릴
0	95	5
11	5	95
13	5	95
13.01	95	5
16.00	95	5
16.01		중지

[0238]

표 4

약어

ACN	아세토니트릴
Ar	아릴
aq	수성
Boc	<i>Tert</i> -부톡시카르보닐
BuLi	부릴리튬
DCM	디클로로메탄
DEAD	디에틸 아조디카르복실레이트
DIAD	디이소프로필 아조디카르복실레이트
DIPEA	디이소프로필에틸아민
DME	1,2-디메톡시에탄
DMF	<i>N,N</i> -디메틸포름아미드
DMF-DMA	<i>N,N</i> -디메틸포름아미드 디메틸아세탈
DMSO	<i>N,N</i> -디메틸су阜시드
DP	약물 풀다운(Drug pulldown)
DTT	디티오트레이톨
EDC	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드
EDTA	에틸렌디아민테트라아세트산
EtOAc	에틸 아세테이트
EtOH	에탄올
eq	당량

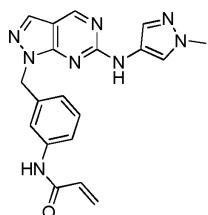
[0239]

g	그램
h	시간
HATU	<i>O</i> -(7-아자벤조트리아졸-1-일)- <i>N,N,N',N'</i> -테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트
HCl	염산
HOEt	1-히드록시벤조트리아졸
IC ₅₀	50% 억제 농도
IPA	이소프로판올
iPr	이소프로필
L	리터
LC-MS	액체 크로마토그래피 질량 분광분석법
M	몰농도
MeOH	메탄올
Mesyl	메탄су포닐 클로라이드
mg	밀리그램
min	분
mL	밀리리터
mm	밀리미터
mmol	밀리몰
mol%	몰 퍼센트
μL	마이크로리터
nm	나노미터
Pd ₂ (dba) ₃	트리스(디벤질리텐아세톤)디팔라듐(0)
PBS	인산 완충 식염수
Prep. HPLC	정제용 고성능 액체 크로마토그래피
PyBroP	브로모트리파롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
rt	실온
RT	체류 시간
sat.	포화
THF	테트라하이드로푸란
tert	3급
Xantphos	4,5-비스(디페닐포스포노)-9,9-디메틸크산텐

[0240]

실험

실시예 1: *N*-(3-((6-((1-메틸-1*H*-파라졸-4-일)아미노)-1*H*-파라졸로[3,4-*d*]파리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드



[0243]

아세토니트릴 (150 mL) 중 6-클로로-1*H*-파라졸로[3,4-*d*]파리미딘 (10 g, 52 mmol), 탄산칼륨 (2 당량) 및 1-(브로모메틸)-3-나트로벤젠 (1.2 당량)의 혼탁액을 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 농축하고, 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 칼럼

크로마토그래피에 의해 정제하여 6-클로로-1-(3-나트로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘을 수득하였다.

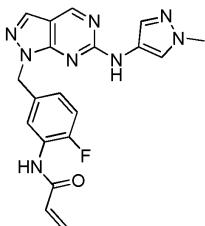
[0245] 이소프로판올 (62 mL) 중 6-클로로-1-(3-나트로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘 (2.2 g, 7.6 mmol)의 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-아민 (2.5 당량) 및 진한 HCl 용액 (0.2 mL)을 첨가하고 반응물을 18시간 동안 90°C에서 가열하였다. 실온으로 냉각 후, 고체를 여과하고, 냉 이소프로판올로 세척한 다음, 공기 건조시켜 N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-(3-나트로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민을 수득하였다.

[0246] MeOH (25 mL) 중 N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-(3-나트로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민 (0.6 g, 1.7 mmol)의 용액에 진한 HCl 용액 (0.6 mL) 및 이어서 탄소상 팔라듐 (60 mg)을 첨가하고 반응물을 2시간 동안 수소 별분하에 교반하였다. 생성 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 여액을 진공 농축하여 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민을 수득하였다.

[0247] DCM (1 mL) 및 DMF (1 mL) 중 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민 (50 mg, 0.16 mmol)의 용액에 DIPEA (2 당량) 및 이어서 아크릴로일 클로라이드 (1.2 당량)를 첨가하고 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 유기물을 포화 NaHCO₃ 수용액 및 이어서 물로 세척하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 375, RT = 7.08 min.

실시예 2:

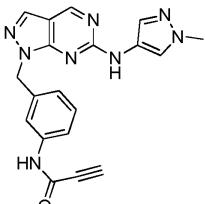
N-(2-플루오로-5-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드



[0249]

[0250] 4-(브로모메틸)-1-플루오로-2-나트로벤젠을 사용하여 실시예 1의 절차에 따라 표제 화합물을 제조하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 393, RT = 7.19 min.

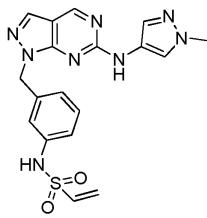
[0251] 실시예 3: N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)페닐)프로피올아미드



[0252]

[0253] DMF (1.5 mL) 중 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민 (실시예 1에서 제조됨) (50 mg, 0.16 mmol)의 용액에 프로피올산 (0.9 당량), DIPEA (3 당량) 및 이어서 PyBOP (1.3 당량)를 첨가하고 반응물을 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 유기물을 포화 NaHCO₃ 수용액 및 이어서 물로 세척하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 정제용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 373, RT = 6.99 min.

[0254] 실시예 4: N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-1H-피라졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)페닐)에텐솔폰아미드

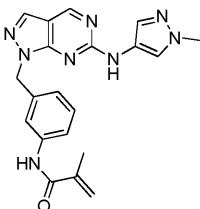


[0255]

DCM (2 mL) 중 2-클로로에탄솔포닐 클로라이드 (1.1 당량)의 용액에 디이소프로필에틸아민 (2.5 당량)을 첨가하고 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1H-페라졸로[3,4-d]페리미딘-6-아민 (실시예 1에서 제조됨) (100 mg, 0.32 mmol) 및 포화 NaHCO_3 수용액 (2 mL)을 첨가하고 반응물을 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 상을 분리하고 생성물을 DCM 내로 추출하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하고 정제용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C. (ES^+) 411, $\text{RT} = 7.17 \text{ min}$.

[0257]

실시예 5: $N - (3 - ((6 - ((1 - \text{메틸} - 1H - \text{페리아졸} - 4 - \text{일}) \text{아미노}) - 1H - \text{페리아졸로}[3, 4 - d] \text{페리미딘} - 1 - \text{일}) \text{메틸}) \text{페닐}) \text{메타크릴아미드}$

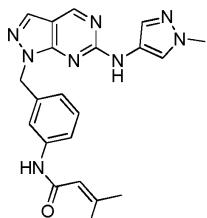


[0258]

메타크릴로일 클로라이드를 사용하여 실시예 1의 절차에 따라 표제 화합물을 제조하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 389, RT = 7.44 min.

[0260]

실시예 6: 3-메틸-N-(3-((6-((1-메틸-1H-페리아졸-4-일)아미노)-1H-페리아졸로[3,4-d]페리미딘-1-일)메틸)페닐)부트-2-엔아미드



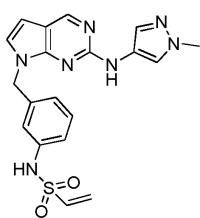
[0261]

3-메틸부트-2-에노일 클로라이드를 사용하여 실시예 1의 절차에 따라 푸제 화합물을 제조하였다.

[0263]

LC-MS 방법 C (ES+) 403 RT = 7.72 min

[0264]



[0265]

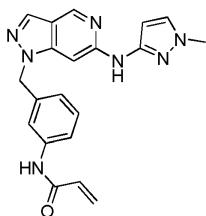
아세토니트릴 (150 mL) 중 2-클로로-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘 (1 g, 6.5 mmol), 탄산칼륨 (2 당량) 및 1-(브로모메틸)-3-니트로벤젠 (1.2 당량)의 혼탁액을 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음 용매를 진공 농축하고 잔류물을 에틸 아세테이트로 희석하고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하여 2-클로로-7-(3-니트로벤젠)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘을 수득하였다.

[0267] 이소프로판올 (2 mL) 중 2-클로로-7-(3-니트로벤질)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘 (100 mg, 0.4 mmol)의 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-아민 (2.5 당량) 및 진한 HCl 용액 (0.05 mL)을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 140°C에서 마이크로웨이브에서 반응시켰다. 그 다음 혼합물을 여과하고, 냉 이소프로판올로 세척한 다음, 공기 건조시켜 N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7-(3-니트로벤질)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민을 수득하였다.

[0268] MeOH (5 mL) 중 N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7-(3-니트로벤질)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민 (80 mg, 0.2 mmol)의 용액에 SnCl_2 를 첨가하고 반응물을 4시간 동안 60°C에서 가열하였다. 실온으로 냉각 후 혼합물을 에틸 아세테이트 내로 추출시키고, 물 및 염수로 세척하고, 건조시키고 (MgSO_4), 진공 농축하여 7-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민을 수득하였다.

[0269] DCM (1 mL) 및 DMF (1 mL) 중 7-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민 (50 mg, 0.16 mmol)의 용액에 DIPEA (2 당량) 및 이어서 아크릴로일 클로라이드 (1.2 당량)를 첨가하고 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음 혼합물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 그 다음 유기물을 포화 NaHCO_3 수용액 및 물로 세척하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 410, RT = 5.76 min.

[0270] 실시예 8: N-(3-((6-((1-메틸-1H-피라졸-3-일)아미노)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아미드



[0271]

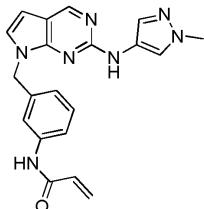
[0272] 아세토니트릴 (30 mL) 중 6-클로로-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘 (1 g, 6.5 mmol), 탄산칼륨 (2 당량) 및 1-(브로모메틸)-3-니트로벤젠 (1.2 당량)의 혼탁액을 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 농축하고, 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 6-클로로-1-(3-니트로벤질)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘을 수득하였다.

[0273] 디옥산 (5 mL) 중 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.1 당량) 및 XANTPHOS (0.2 당량)의 탈기 용액에 탄산세슘 (2 당량), 1-메틸-1H-피라졸-3-아민 (1.2 당량) 및 6-클로로-1-(3-니트로벤질)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘 (100 mg, 0.34 mmol)을 첨가하고 반응물을 18시간 동안 110°C에서 가열하였다. 실온으로 냉각 후, 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 N-(1-메틸-1H-피라졸-3-일)-1-(3-니트로벤질)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-6-아민을 수득하였다.

[0274] MeOH (5 mL) 중 N-(1-메틸-1H-피라졸-3-일)-1-(3-니트로벤질)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-6-아민 (50 mg, 0.14 mmol)의 용액에 진한 HCl 용액 (0.1 mL) 및 이어서 탄소상 팔라듐 (10 mg)을 첨가하고 반응물을 2시간 동안 수소 벌룬하에 교반하였다. 생성 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 여액을 진공 농축하여 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-3-일)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-6-아민을 수득하였다.

[0275] DCM (1 mL) 및 DMF (1 mL) 중 1-(3-아미노벤질)-N-(1-메틸-1H-피라졸-3-일)-1H-피라졸로[4,3-c]피리딘-6-아민 (40 mg, 0.13 mmol)의 용액에 DIPEA (2 당량) 및 이어서 아크릴로일 클로라이드 (1.2 당량)를 첨가하고 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 유기물을 포화 NaHCO_3 수용액 및 이어서 물로 세척하고, 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 농축하고 정제용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 374, RT = 5.38 min.

[0276]

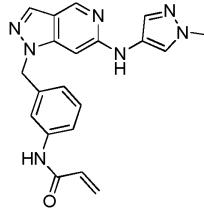
실시예 9: *N*-(3-((2-((1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노)-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-7-일)메틸)페닐)아크릴아민드

[0277]

[0278]

DCM (1 mL) 및 DMF (1 mL) 중 7-(3-아미노벤질)-*N*-(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-2-아민 (실시예 7에서 제조됨) (20 mg, 0.06 mmol)의 용액에 DIPEA (2 당량) 및 이어서 아크릴로일 클로라이드 (1.2 당량)를 첨가하고 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 유기물을 포화 NaHCO₃ 수용액 및 이어서 물로 세척하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 정제용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 374, RT = 5.75 min.

[0279]

실시예 10: *N*-(3-((6-((1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘-1-일)메틸)페닐)아크릴아민드

[0280]

[0281]

아세토니트릴 (30 mL) 중 6-클로로-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘 (1 g, 6.5 mmol), 탄산칼륨 (2 당량) 및 1-(브로모메틸)-3-나트로벤젠 (1.2 당량)의 혼탁액을 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 진공 농축하고, 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 6-클로로-1-(3-나트로벤질)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘을 수득하였다.

[0282]

디옥산 (5 mL) 중 Pd₂(dba)₃ (0.1 당량) 및 XANTPHOS (0.2 당량)의 탈기 용액에 탄산세슘 (2 당량), 1-메틸-1*H*-피라졸-4-아민 (1.2 당량) 및 6-클로로-1-(3-나트로벤질)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘 (100 mg, 0.34 mmol)을 첨가하고 반응물을 18시간 동안 110°C에서 가열하였다. 실온으로 냉각 후, 반응물을 에틸 아세테이트로 희석하고 물로 세척하였다. 유기물을 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 *N*-(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-1-(3-나트로벤질)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘-6-아민을 수득하였다.

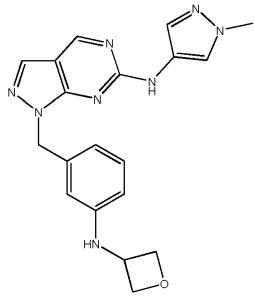
[0283]

MeOH (5 mL) 중 *N*-(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-1-(3-나트로벤질)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘-6-아민 (50 mg, 0.14 mmol)의 용액에 진한 HCl 용액 (0.1 mL) 및 이어서 탄소상 팔라듐 (10 mg)을 첨가하고 반응물을 2시간 동안 수소 별분하에 교반하였다. 생성 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 여액을 진공 농축하여 1-(3-아미노벤질)-*N*-(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘-6-아민을 수득하였다.

[0284]

DCM (1 mL) 및 DMF (1 mL) 중 1-(3-아미노벤질)-*N*-(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)-1*H*-피라졸로[4,3-*c*]피리딘-6-아민 (25 mg, 0.08 mmol)의 용액에 DIPEA (2 당량) 및 이어서 아크릴로일 클로라이드 (1.2 당량)를 첨가하고 반응물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 DCM으로 희석하고 1M HCl 수용액으로 세척하였다. 유기물을 포화 NaHCO₃ 수용액 및 이어서 물로 세척하고, 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 농축하고 정제용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 수득하였다. LC-MS 방법 C, (ES+) 374, RT = 5.38 min.

[0285] 참조 실시예 1: *N*-(1-메틸-1*H*-파라졸-4-일)-1-(3-(옥세탄-3-일아미노)벤질)-1*H*-파라졸로[3,4-*d*]파리미딘-6-아민



[0286]

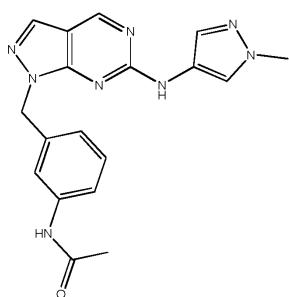
[0287] 당해 화합물을 상기한 것과 유사한 절차에 의해 합성하였다. 또한 문헌 [WO 2012/022681 A2, 121면, 실시예 114]을 참조한다.

[0288]

참조 실시예 2:

[0289]

N-(3-((6-((1-메틸-1*H*-파라졸-4-일)아미노)-1*H*-파라졸로[3,4-*d*]파리미딘-1-일)메틸)페닐)아세트아미드



[0290]

[0291] 당해 화합물을 상기한 것과 유사한 절차에 의해 합성하였다.

[0292]

참조 실시예 3: JAK3 억제제 CP 690,550 (문헌 [Chang et al., 2003, Science 302(5646):875-888]).

[0293]

생물학적 검정

[0294]

본 발명에 따른 화합물이 키나제의 면역검출을 사용한 키노비즈(Kinobeads)TM 검정에서 야누스 키나제 (JAK 패밀리)에 미치는 영향의 측정

[0295]

검정의 원리

[0296]

이전 실시예에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물을 ZAP-70 (WO-A 2007/137867)에 기재된 바와 같이 키노비즈TM 검정으로 시험하였다. 간략하게, 시험 화합물 (다양한 농도로) 및 고정화된 아미노파리도-파리미딘 리간드 24를 포함하는 친화도 매트릭스를 세포 용해물 분취액에 첨가하고 용해물 샘플 중 단백질에 결합시켰다. 인큐베이션 시간 후, 단백질이 포획되어 있는 비드를 용해물로부터 분리하였다. 그 다음, 결합된 단백질을 용리시키고, 도트 블롯 절차 및 오디세이(Odyssey) 적외 검출 시스템에서 특이적 항체를 사용하여 JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2의 존재를 검출하고 정량화하였다. 개개의 키나제에 대한 용량 반응 곡선을 제작하고 IC₅₀ 값을 산출하였다. ZAP-70 (WO-A 2007/137867) 및 키나제 선택성 프로파일링 (WO-A 2006/134056)에 대한 키노비즈TM 검정은 앞서 기재되었다.

[0297]

프로토콜

[0298]

친화도 매트릭스의 세척

[0299]

친화도 매트릭스를 0.2% NP40 (이게팔(IGEPAL)[®] CA-630, 시그마(Sigma), #I3021)을 함유하는 1x DP 완충제 15 mL로 2회 세척한 다음, 0.2% NP40 (3% 비드 슬러리)을 함유하는 1xDP 완충제에 재현탁시켰다.

[0300]

5xDP 완충제: 250 mM 트리스(Tris)-HCl pH 7.4, 25% 글리세롤, 7.5 mM MgCl₂, 750 mM NaCl, 5 mM Na₃VO₄; 0.22 μm 필터를 통해 5xDP 완충제를 여과하고 -80°C에서 분취액으로 보관함. 5xDP 완충제를 H₂O을 사용하여 1 mM DTT 및 25 mM NaF를 함유하는 1xDP 완충제로 희석한다.

[0301] 시험 화합물의 제조

[0302] 시험 화합물의 스톡 용액을 DMSO에서 제조하였다. 96 웰 플레이트에서, DMSO 중 5 mM로 희석된 시험 화합물의 용액 30 μ L를 제조하였다. 이 용액으로 출발하여 1:3 희석 시리즈 (9 단계)를 제조하였다. 대조 실험 (시험 화합물 없음)을 위해 2% DMSO를 함유하는 완충제를 사용하였다.

[0303] 세포 배양 및 세포 용해물의 제조

[0304] 몰트(Molt)4 세포 (ATCC 카탈로그 번호 CRL-1582) 및 라모스(Ramos) 세포 (ATCC 카탈로그 번호 CRL-1596)를 0.15×10^6 개 내지 1.2×10^6 개 세포/mL의 밀도로 10% 소 태아 혈청 (인비트로겐(Invitrogen))으로 보충된 RPMI 1640 배지 (인비트로겐, #21875-034) 중 혼탁액으로 1L 스피너(Spinner) 플라스크 (인테그라 바이오사이언시스(Integra Biosciences), #182101)에서 성장시켰다. 세포를 원심분리에 의해 채취하고, 1 x PBS 완충제 (인비트로겐, #14190-094)로 1회 세척하고, 세포 펠릿을 액체 질소에서 냉동시킨 후, -80°C에서 보관하였다. 세포를 용해 완충제: 50 mM 트리스-HCl, 0.8% NP40, 5% 글리세롤, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM NaF, 1 mM 나이트륨 바나데이트, 1 mM DTT, pH 7.5 중에서 포터(Potter) S 균질기로 균질화시켰다. 25 mL 완충제당 하나의 완전 EDTA-무함유(free) 정제 (프로테아제 억제제 칵테일, 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics), 1873580)를 첨가하였다. 기계화된 포터 S를 사용하여 상기 물질을 10회 다운싱(doucing)하고, 50 mL 팔콘(falcon)관으로 옮기고, 얼음에서 30분 동안 인큐베이션하고 4°C에서 20,000 g에서 10분 동안 스판 다운시켰다 (소르볼(Sorvall) SLA600에서 10,000 rpm, 예비냉각됨). 상청액을 초원심분리 (UZ)-폴리카르보네이트 관 (베크만(Beckman), 355654)으로 옮기고 4°C에서 100,000 g에서 1시간 동안 스판시켰다 (Ti50.2에서 33,500 rpm, 예비냉각됨). 상청액을 새로운 50 mL 팔콘관으로 다시 옮기고, 단백질 농도를 브래드포드(Bradford) 검정 (바이오래드(BioRad))에 의해 측정하고, 분취액당 50 mg의 단백질을 함유하는 샘플을 제조하였다. 샘플을 실험에 즉시 사용하거나 액체 질소에서 냉동시키고 -80°C에서 냉동 보관하였다.

[0305] 세포 용해물의 희석

[0306] 세포 용해물 (플레이트당 대략 50 mg 단백질)을 실온의 수조에서 해동시킨 다음, 얼음에 보관하였다. 해동시킨 세포 용해물에 프로테아제 억제제를 함유하는 1xDP 0.8% NP40 완충제 (25 mL 완충제에 대해 1개의 정제; EDTA-무함유 프로테아제 억제제 칵테일; 로슈 다이아그노스틱스 1873580)를 첨가하여 최종 단백질 농도가 10 mg/mL 총 단백질에 이르게 하였다. 희석된 세포 용해물을 얼음에 보관하였다. 혼합한 몰트4/라모스 용해물을 1 부피의 몰트4 용해물 및 2 부피의 라모스 용해물 (비 1:2)을 배합하여 제조하였다.

[0307] 시험 화합물 및 친화도 매트릭스를 사용한 용해물의 인큐베이션

[0308] 96 웰 필터 플레이트 (멀티스크린(Multiscreen) HTS, BV 필터 플레이츠(Filter Plates), 밀리포어(Millipore) #MSBVN1250)에 웰당 100 μ L 친화도 매트릭스 (3% 비드 슬러리), 3 μ L의 화합물 용액, 및 50 μ L의 희석 용해물을 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 750 rpm으로 플레이트 진탕기 (헤이돌프 티라맥스(Heidolph tiramax) 1000) 상에서 저온실에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 플레이트를 230 μ L 세척 완충제 (1xDP 0.4% NP40)로 3회 세척하였다. 필터 플레이트를 콜렉션 플레이트 (그레이너 바이오-원(Greiner bio-one), PP-마이크로플레이트 96 웰 V-형, 65120)의 맨 위에 위치시킨 다음, 비드를 20 μ L의 샘플 완충제 (100 mM 트리스, pH 7.4, 4% SDS, 0.00025% 브로모페놀 블루, 20% 글리세롤, 50 mM DTT)로 용리시켰다. 용리액을 -80°C에서 급냉시키고 -20°C에서 보관하였다.

[0309] 용리된 키나제의 검출 및 정량화

[0310] 니트로셀룰로스 막 상에 스폿팅하고 대상 키나제에 대해 지정되는 1차 항체 및 형광 표지된 2차 항체 (항-토끼 IRDye™ 항체 800 (리코르(Licor), # 926-32211)를 사용함으로써 용리액 중 키나제를 검출하고 정량화하였다. 리코르 바이오사이언시스(LI-COR Biosciences) (미국 네브라스카주 링컨)로부터의 오디세이 적외 이미징 시스템을 제조업체에 의해 제공된 사용설명서에 따라 작동시켰다 (문헌 [Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Published May 2004 by LI-COR Biosciences, www.llicor.com]).

[0311] 용리액의 스폿팅 후, 니트로셀룰로스 막 (바이오틴레이스(BioTrace) NT; 폴(PALL), #BTNT30R)을 우선 실온에서 1시간 동안 오디세이 차단 완충제 (리코르, 927-40000)와 함께 인큐베이션하여 차단하였다. 그 다음, 차단된 막을 표 5에 나타낸 온도에서 16시간 동안 오디세이 차단 완충제 (리코르 #927-40000)에 희석시킨 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 막을 실온에서 0.2% 트윈(Tween) 20을 함유하는 PBS 완충제를 사용하여 10분

동안 2회 세척하였다. 그 다음, 막을 오디세이 차단 완충제 (리코르 #927-40000)에 희석시킨 검출 항체 (항-토끼 IRDye™ 항체 800, 리코르, # 926-32211)와 함께 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 막을 실온에서 0.2% 트윈 20을 함유하는 1 x PBS 완충제를 사용하여 각각 10분 동안 2회 세척하였다. 그 다음, 막을 PBS 완충제로 1회 헹구어 잔여 트윈 20을 제거하였다. 막을 4°C에서 PBS 완충제에 유지시킨 다음, 오디세이 기기로 스캔하였다. 제조업체의 사용설명서에 따라 형광 신호를 기록하고 분석하였다.

표 5

항체의 공급원 및 희석 액

표적 키나제	1차 항체 (희석)	1차 인큐베이션 온도	2차 항체 (희석)
JAK1	셀 시그널링 (Cell signalling) #3332 (1:100)	4°C	리코르 항-토끼 800 (1:15000)
JAK2	셀 시그널링 #3230 (1:100)	실온	리코르 항-토끼 800 (1:15000)
JAK3	셀 시그널링 #3775 (1:100)	4°C	리코르 항-토끼 800 (1:5000)
TYK2	셀 시그널링 #06-638 (1:1000)	실온	리코르 항-토끼 800 (1:5000)

[0312]

결과

[0313]

표 6은 JAK 키노비즈™ 검정에서 본 발명의 선택된 화합물에 대한 데이터를 제공한다.

표 6

항체 검출을 사용한 키노비즈™ 검정에서 측정된 마와 같은 억제값 (IC₅₀, nM)

실시 예	JAK1	JAK2	JAK3	Tyk2
1	>10000	>10000	5	>10000
2	>10000	>10000	16	>10000
3	>10000	>10000	10	6958
4	>10000	>10000	10	6132
5	>10000	>10000	57	>10000
6	>10000	>10000	1309	>10000
7	7694	>10000	12	901
8	>10000	>10000	5	>10000
9	9420	>10000	3	8083
10	5368	>10000	1	5080
참조 실시 예 2	>10000	>10000	206	>10000

[0315]

키나제의 정량적 질량 분광 검출을 사용한 키노비즈™ 검정에서 화합물의 키나제 선택성 프로파일링

[0316]

이전 실시예에서 기재한 바와 같은 본 발명의 선택된 화합물을 기재된 바와 같이 키노비즈™ 검정으로 시험하였다 (문헌 [WO-A 2006/134056]; [Bantscheff et al., 2007. Nature Biotechnol. 25, 1035-1044]).

[0317]

화합물을 4°C에서 45분 동안 세포 용해물 분획액 (저캣(Jurkat) 및 라모스 세포 용해물의 1:1 혼합물)과 함께 인큐베이션하고 용해물 샘플 중 단백질에 결합시켰다. 그 다음, 키노비즈™ 친화도 매트릭스를 첨가하여 이전

에 첨가된 화합물과 상호작용하고 있지 않은 단백질을 포획하였다. 4°C에서 이러한 2시간 인큐베이션 단계 후 비드를 용해물로부터 분리하고 비드 결합 단백질을 SDS 샘플 완충제에 용리시킨 후 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하였다. 겔을 콜로이달 쿠마시(colloidal Coomassie)로 염색하고 각각의 겔 레인(lane)의 염색된 영역을 절단해 내고 트립신과 함께 겔 내(in-gel) 단백질 분해에 적용시켰다. 상이한 겔 영역으로부터 기원한 웨티드를 표 7에 나타낸 바와 같이 등압 태깅 시약(isobaric tagging reagent) (TMT 시약, 써모피셔 (Thermofisher))으로 표지화하였다. TMT 시약은 웨티드의 동시 확인 및 정량을 가능하게 하는, 6개 이하의 상이한 생물학적 샘플에서 웨티드를 표지화할 수 있는 한 세트의 다중화된, 아민-특이적, 안정한 동위원소 시약이다. 합해진 샘플을 pH 11에서 역상 크로마토그래피를 사용하여 분별한 후, 분획을 텐덤(tandem) 질량 분광계 (LC-MS/MS) 실험에 온라인으로 연결된 나노-유동(nano-flow) 액체 크로마토그래피 시스템으로 분석한 후 MS/MS 스펙트럼에서 리포터 이온 정량화하였다 (문헌 [Ross et al., 2004. Mol. Cell. Proteomics 3(12):1154-1169]; [Dayon et al., 2008. Anal. Chem. 80(8):2921-2931]; [Thompson et al., 2003. Anal. Chem. 75(8):1895-1904]). 추가의 실험 프로토콜은 WO2006/134056 및 선행 간행물 (문헌 [Bantscheff et al., 2007. Nat. Biotechnol. 25, 1035-1044]; [Bantscheff et al., 2011. Nat. Biotechnol. 29(3):255-265])에서 찾을 수 있다.

표 7

TMT 등압 태깅 시약을 사용한 웨티드의 표지화

샘플	화합물 농도 (nM)	TMT6 시약
1	3000	126
2	750	127
3	187	128
3	47	129
5	12	130
6	0	131

[0319]

표 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 선택된 화합물의 키나제 선택성 프로파일을 이전에 기재된 바와 같이 키나제의 질량 분광 검출을 사용한 키노비즈 검정으로 측정하였다 (문헌 [Bantscheff et al., 2007. Nat. Biotechnol. 25(9):1035-1044]; [WO-A 2006/134056]).

표 8

정량적 질량 분광법을 사용한 키노비즈™ 검정으로 측정된 바와 같은 억제값 (IC₅₀, nM)

실시 예	BTK	TEC	BLK	ITK
1	12	12	20	86
2	72	34	406	818
3	12	n.d.	12	12

(n.d.=측정되지 않음)

[0321]

본 발명에 따른 화합물이 키나제 검정에서 BLK, BTK, ITK 및 JAK3에 미치는 영향의 측정

방사측정(radiometric) 단백질 키나제 검정 (³³판퀴나제(PanQinase)[®]) 활성 검정; 프로퀴나제 게엠베하 (ProQinase GmbH), 독일 프라이부르크)을 단백질 키나제 BLK, BTK, ITK 및 JAK3의 키나제 활성을 측정하는데 사용하였다. 모든 키나제 검정을 50 μ l 반응 부피로 퍼킨엘머(PerkinElmer) (미국 매사추세츠주 보스톤)로부터 96-웰 플래시플레이츠(FlashPlates)TM에서 수행하였다. 반응 칵테일을 다음 순서로 4개의 단계로 피펫팅하였다:

20 μ l의 검정 완충제 (표준 완충제)

5 μ l의 ATP 용액 (H_2O 중)

- [0326] 5 μ l의 시험 화합물 (10% DMSO 중)
- [0327] 10 μ l의 기질/ 10 μ l의 효소 용액 (예비혼합됨)
- [0328] 모든 효소에 대한 검정은 70 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-오르토바나데이트, 1.2 mM DTT, ATP/[γ -³³P]-ATP (각각의 키나제의 겉보기 ATP-K_m에 상응하는 가변 양), 단백질 키나제, 및 기질을 함유하였다 (표 9).
- [0329] 반응 칵테일을 60분 동안 30°C에서 인큐베이션하였다. 반응을 50 μ l의 2% (v/v) H₃PO₄를 사용하여 중지시키고, 플레이트를 흡입하고 200 μ l의 0.9% (w/v) NaCl로 2회 세척하였다. ³³P_i의 혼입을 마이크로플레이트 섬광 계수기 (마이크로베타(Microbeta), 월락(Wallac))로 측정하였다. 베크만콜터(Beckman Coulter)/사기안(SAGIAN)TM 코어 시스템(Core System)을 사용하여 모든 검정을 수행하였다

표 9

효소 및 기질

키나제	키나제 농도 ng/50 μ l	ATP 농도 μ M	기질	기질 농도 μ g/50 μ l
BTK	20	3.0	풀리(Glu, Tyr)4:1	0.125
ITK	50	1.0	풀리(Glu, Tyr)4:1	0.125
JAK3	100	0.3	풀리(Ala,GLU,Lys,Tyr)6:2:5:1	0.125

[0330]

표 10은 키나제 검정에서 본 발명의 선택된 화합물에 관한 데이터를 제공한다

표 10

프로퀴나제 효소 검정 데이터 (IC₅₀ 값, nM)

실시예	BLK	BTK	ITK	JAK3
1	nd	20	230	3
2	2000	323	n.d.	n.d.
3	n.d.	1	3	4
4	n.d.	20	80	7
참조 실시예 2	n.d.	2000	불활성	290

(n.d. = 측정되지 않음)

[0332]

세포 검정

pSTAT5 검정

검정 원리

[0336] STAT5 인산화는 JAK3 활성화의 신호전달 캐스케이드 하류에서의 근위 (proximal) 현상 중 하나를 나타낸다. 따라서 STAT5 인산화는 JAK3 억제의 기계론적 영향을 평가하는 적절한 판독이다. 인터류킨-2(IL-2)를 사용한 인간 YT 세포, NK-유사 세포주의 자극으로 티로신 잔기 694 (Tyr694)에서 STAT5의 인산화가 초래되며 이는 특이적 항체 및 적절한 검출 방법 (이 경우에 알파스크린(AlphaScreen) 검정 기술)을 사용한 면역검정에 의해 정량적으로 측정될 수 있다.

[0337]

검정 프로토콜

[0338] 세포 배양 및 세포 시딩

[0339] 인간 YT 세포를 2 mM L-글루타민 (인비트로겐, 25030-024) 및 10% 가열-불활성화된 FBS (인비트로겐, 10106-169)를 갖는 RPMI 배지 (론자(Lonza), BE12-167)에서 성장시키고 가습 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂)에서 유지시켰다. 세포를 원심분리에 의해 채취하고, HBSS (인비트로겐, 14180-046)로 1회 세척하고, 1.5x10⁶ 개 세포/ml로 HBSS에 재현탁시키고 0.9x10⁴ 개 세포를 96 웰 플레이트 (퍼킨엘머, 6005569)에서 웰당 6 μl로 시팅하였다.

[0340] 시험 화합물을 사용한 처리 및 IL-2 자극

[0341] 시험 화합물을 DMSO에 용해시키고 1:3 희석 시리즈 (9 단계)를 제조하였다. 용량 반응 곡선을 제작하기 위해서, 4% DMSO/HBSS 중 3 μl의 4배 농축된 화합물을 96 웰 플레이트 중 각각의 세포 샘플에 첨가하여 그 결과 최종 DMSO 농도가 1% DMSO로 되었다. 세포를 가습 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 각각의 웰에 3 μl의 4배 농축된 IL-2 용액 (재조합 인간 IL-2, 페프로테크(Peprotech) 200-02; HBSS 중 120 nM 용액)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 3 μl의 5x 용해 완충제 (슈어화이어 (SureFire) 용해 완충제; 퍼킨 엘머, TGRS5S10K)를 첨가함으로써 세포를 용해시키고 온화하게 진탕시키면서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0342] 신호 검출

[0343] 알파스크린® 기술에 의한 신호 검출을 위해 슈어화이어 포스포(phospho)-STAT5 (Tyr694/Tyr699) 키트를 제조업체 (퍼킨 엘머, TGRS5S10K)에 의해 제공된 사용설명서에 따라 사용하였다. 수용체 비드를 제조업체에 의해 권장된 바와 같이 (재활성화 완충제 / 활성화 완충제 / 수용체 비드를 40:10:1의 비율로) 첨가하고 온화하게 진탕시키면서 1.5시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 다음, 공여체 비드를 권장된 바와 같이 (희석 완충제 / 공여체 완충제를 20:1의 비율로) 첨가하고 온화하게 진탕시키면서 1.5시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 알파스크린 프로토콜을 사용하여 인비젼(Envision) 기기 (퍼킨 엘머) 상에서 관독하였다. 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응에 관한 비선형 회귀를 사용하여 생물학적 검정으로 데이터를 분석하였다.

[0344] 표 11은 pSTAT5 세포 검정에서 본 발명의 선택된 화합물에 관한 데이터를 제공한다.

표 11

pSTAT5 세포 검정 데이터 (IC₅₀ 값, nM)

설시에	pSTAT5
1	31
2	378
3	33
4	74
5	2005
7	79

[0345]

[0346] 화합물의 워시아웃을 사용한 세포 검정

[0347] 검정 원리

[0348] 이러한 시간 과정 실험으로, 시험된 화합물의 약리 작용이 심지어 화합물이 세포 샘플로부터 제거된 후에도 시간 경과에 따라 지속되는지의 여부를 측정하는 것이 가능하다.

[0349] 검정 프로토콜

[0350] 세포 배양 및 세포 시딩

[0351] 인간 YT 세포를 상기한 바와 같이 성장시켰다. 세포를 원심분리에 의해 채취하고 RPMI/0.5% 가열-불활성화된 FBS에서 재현탁시켰다. 3x10⁵ 개 세포를 환저 96 웰 플레이트 (BD-팔콘(Falcon), 353077) 중 웰당 60 μl로 시

딩하였다 .

[0352] 시험 화합물을 사용한 처리 및 IL-2 자극

[0353] 시험 화합물을 DMSO에 용해시키고 1:3 희석 시리즈 (9 단계)를 제조하였다. 용량 반응 곡선을 제작하기 위해서, 4% DMSO/RPMI/0.5% FBS 중 30 μ l의 4배 농축된 화합물을 96 웰 플레이트 중 각각의 세포 샘플에 첨가하여 그 결과 최종 DMSO 농도가 1% DMSO로 되었다. 세포를 가습 인큐베이터 (37°C , 5% CO_2)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 세포를 원심분리에 의해 2회 세척하고 배지 (RPMI/0.5% FBS)를 대체하며, 단, 시간 0 플레이트는 제외하였다. 세척된 세포를 가습 인큐베이터 (37°C , 5% CO_2)에서 30분, 1, 2 및 4시간 동안 인큐베이션한 이후에 IL-2로 자극하였다. 각각의 웰에 30 μ l의 4배 농축된 IL-2 용액 (제조합 인간 IL-2, 폐프로테크 200-02; RPMI 중 120 nM 용액)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 30 μ l의 5x 용해 완충제 (MSD 용해 완충제)를 첨가함으로써 세포를 용해시키고 온화하게 진탕시키면서 4°C 에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0354] 신호 검출

[0355] 화합물이 STAT5 인산화에 미치는 영향을 제조업체의 프로토콜에 따라 MSD 멀티-스폿(MULTI-SPOT)® 96 4-스폿 포스포트-STAT5a,b 전세포 용해물 키트 (메소스케일 디스커버리(MesoScale Discovery), K150IGD-3)를 사용하여 용해물에서 측정하였다. 가변 기울기를 갖는 S자형 용량-반응에 관한 비선형 회귀를 사용하여 생물학적 검정으로 데이터를 분석하고 IC_{50} 값을 측정하였다.

[0356] 결과

[0357] 참조 실시예 3 (JAK3 억제제 CP690,550)에 관해, 세포의 세척 후 활성의 상당한 저하가 관찰되었고 억제 활성은 1시간 후 완전히 상실되었다. 참조 실시예 2의 활성은 세척 후 30분에 완전히 상실되었다. 그에 반해서, 실시예 1 및 3은 활성의 일부 저하와 함께 세척 후 4시간까지의 동안 활성을 보유하였다.

[0358] 표 12는 세포 위시아웃 연구에서 본 발명의 선택된 화합물 및 참조 화합물에 관한 데이터를 제공한다.

표 12

화합물의 위시아웃 후 IL-2 자극된 YT 세포에서 pSTAT5 억제 (pIC_{50} 값)의 시간 과정

실시예	0 분 (세척 안함)	30 분	1 시간	2 시간	4 시간
참조 실시예 3	7.6, 7.8	5.1	불활성	불활성	불활성
참조 실시예 1	5.8, 5.7	불활성	불활성	불활성	불활성
실시예 1	8.3, 7.6	6.7	7.2, 6.5	7.2	7.0
실시예 3	7.5, 6.4	6.2	6.9, 6.2	7.1	6.9

[0359]

[0360] 실시예 1의 화합물에 의해 변형된 JAK3 웹티드의 질량 분광 확인

[0361] 검정의 원리

[0362] 화합물 처리 후 면역침전된 JAK3의 질량 분광 분석을 사용하여 실시예 1의 화합물이 JAK3에 공유 결합하는지의 여부를 측정하였다. 저켓 세포 용해물을 45분 동안 10 μM 의 실시예 1의 화합물과 함께 사전-배양하였다. 대조 샘플을 화합물 없이 (DMSO 대조군) 배양하였다. 후속적으로 JAK3을 항-JAK3 항체 (아브캄(Abcam) ab4514 1)와 함께 면역침전시켰다. 게다가, 항-IgG을 사용하여 대조 실험을 수행하였다 (모조(mock) 면역침전). 침전 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하였다. 겔을 콜로이달 쿠마시로 염색하고 각각의 겔 레인의 염색된 영역을 절단해 내고 트립신과 함께 겔 내 단백질 분해에 적용시켰다. 3개의 샘플로부터 기원한 웹티드를 표 13에 나타낸 바와 같이 iTRAQ 시약으로 표지화하고 합해진 샘플을 텐덤 질량 분광계 (LC-MS/MS) 실험에 온라인으로 연결된 나노-유동 액체 크로마토그래피 시스템으로 분석한 후 MS/MS 스펙트럼에서 iTRAQ 리포터 이온 정량화하였다 (문현 [Ross et al., 2004. Mol. Cell. Proteomics 3(12):1154-1169]). JAK3을 함유하는 겔 영역을 오르비트랩 벨로스(Orbitrap Velos) 질량 분광계 상에서 HCDiq (고 질량 정확도 MS/MS 스펙트럼)

을 사용하여 270분 동안 분석하였다. 마스코트(Mascot) 검색을 위해 실시예 1의 화합물에 의한 시스테인의 가변 변형이 부가된 표준 파라미터를 사용하였다. 추가의 실험 프로토콜은 WO2006/134056 및 선행 간행물 (문헌 [Bantscheff et al., 2007. Nat. Biotechnol. 25, 1035-1044])에서 찾을 수 있다.

표 13

iTRAQ 등압 태깅 시약을 사용한 펩티드의 표지화

샘플	화합물	항체	iTRAQ 시약
1	10 μ M 실시예 1	항-JAK3, Abcam ab45141	115
2	0.25 % DMSO	항-JAK3, Abcam ab45141	116
3	0.25 % DMSO	토끼 IgG, 시그마 I5006	117

[0363]

프로토콜

1. 세포 용해물의 제조

저캣 세포 (ATCC 카탈로그 번호 TIB-152 저캣, 클론 E6-1)를 0.15×10^6 개 내지 1.2×10^6 개 세포/mL의 밀도로 10% 소 태아 혈청 (인비트로겐)으로 보충된 RPMI 1640 배지 (인비트로겐, #21875-034) 중 혼탁액에 1 리터 스피너 플라스크 (인테그라 바이오사이언시즈, #182101)에서 성장시켰다. 세포를 원심분리에 의해 채취하고, 1 x PBS 완충제 (인비트로겐, #14190-094)로 1회 세척하고, 세포 펠릿을 액체 질소에서 냉동시킨 후 -80°C에서 보관하였다. 저캣 세포를 용해 완충제: 50 mM 트리스-HCl, 0.8% NP40, 5% 글리세롤, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 25 mM NaF, 1 mM 나트륨 바나데이트, 1 mM DTT, pH 7.5 중에서 포터 S 균질기에서 균질화시켰다. 25 mL 완충제당 하나의 완전 EDTA-무함유 정제 (프로테아제 억제제 칵테일, 로슈 다이아그노스틱스, 1873580)를 첨가하였다. 기계화된 포터 S를 사용하여 상기 물질을 10회 다운싱하고, 50 mL 팔콘관으로 옮기고, 얼음에서 30분 동안 인큐베이션하고, 4°C에서 20,000 g에서 10분 동안 스픬 다운시켰다 (소르볼 SLA600에서 10,000 rpm, 예비냉각됨). 상청액을 초원심분리 (UZ)-폴리카르보네이트 관 (베크만, 355654)으로 옮기고 4°C에서 100,000 g에서 1시간 동안 스픬시켰다 (Ti50.2에서 33,500 rpm, 예비냉각됨). 상청액을 새로운 50 mL 팔콘관으로 다시 옮기고, 단백질 농도를 브래드포드 검정 (바이오래드)에 의해 측정하고, 분취액당 50 mg의 단백질을 함유하는 샘플을 제조하였다. 샘플을 실험에 즉시 사용하거나 액체 질소에서 냉동시키고 -80°C에서 냉동 보관하였다.

2. 단백질의 면역침전

항체의 커플링

항체를 1급 아민을 통해 활성화 비딩된 아가로스에 공유 커플링시켰다. 아미노링크(AminoLink)® 플러스 커플링 반응 (써모 사이언티픽 인코퍼레이티드(Thermo Scientific Inc.), 미국 일리노이주 61105 랙포드)은 (지지체 상에) 알데히드와 (항체 상에) 아민 간의 시프(Schiff) 염기 결합의 자발적 형성 및 경도의 (mild) 환원제 (시아노수소화붕소나트륨)와 함께 인큐베이션에 의한 후속적 안정화를 포함한다. 200 μ l 아미노링크® 수지 (써모 사이언티픽 인코퍼레이티드, 20501)를 적절한 농도로 한 배치(batch)에서 항-JAK3 항체 (80 μ l 아브캄 ab45141, 로트(Lot) GR5571-5)와 커플링시켰다. 모조 면역침전을 위해 적절한 양의 토끼 IgG (80 μ g 시그마 I5006)을 100 μ l 아미노링크® 수지 (써모 사이언티픽 인코퍼레이티드, 20501)에 커플링시켰다.

아미노링크® 수지를 10 비드 부피의 PBS로 3회 세척한 후 항체 용액을 1.5 mL 실리콘화 마이크로퓨즈 (microfuge) 관에서 수지에 첨가하였다. 1M NaCNBH₃ (써모 사이언티픽 인코퍼레이티드, 44892)를 0.01M NaOH (1M NaOH로부터 제조됨, 머크(Merck), 109137)에서 새로이 제조하고 1 mL 반응 부피당 25 μ l를 첨가하였다. 혼합물을 4°C 회전 (네오랩 로테이터(NeoLab Rotator), 2-1175)에서 밤새 인큐베이션하였다. 소량의 상청액을 유지하여 브래드포드 검정에 의해 커플링 효율성을 측정하고, 나머지는 폐기하였다. 비드를 10 비드 부피의 1 M 트리스 pH 7.4 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), S5150)로 2회 세척하였다. 1 M 트리스 pH 7.4를 1:1의 비율로 비드에 첨가하고, 1 mL 반응 부피당 25 μ l의 새로이 제조된 NaCNBH₃을 첨가하고 실온에서 30분 동안

회전 인큐베이션하였다. 상청액을 폐기하고 비드를 10 비드 부피의 1 M NaCl (5 M NaCl로 제조됨, 시그마-알드리치, S5150)로 2회 세척하였다. 사용 전에 비드를 0.2% NP40을 갖는 용해 완충제 (DTT 없이)로 2회 세척하였다.

[0371] 화합물을 사용한 세포 용해물의 인큐베이션 및 면역침전

[0372] 세포 용해물을 해동시키고, DTT 없이 용해 완충제 및 NP40으로 1:1 희석하고 추가로 0.4% NP40 (DTT 없음)을 함유하는 용해 완충제로 5 mg/ml 단백질 농도로 희석하였다. 용해물을 초원심분리관 (베크만, 355654)으로 옮기고 4°C에서 100.000 x g에서 20분 동안 원심분리하였다 (Ti50.2에서 33.500 rpm, 예비냉각됨). 상청액을 새로운 팔콘관으로 옮겼다.

[0373] 한편 화합물의 4 mM 용액을 30 mM 스톡 용액을 DMSO로 희석함으로써 제조하였다. 5 μl의 4 mM 화합물 용액 및 2 ml 초원심분리된 용해물 (샘플당 10 mg 단백질)을 4°C에서 45분 동안 회전(end-over-end) 진탕기 (로토 셰이크 게니(Roto Shake Genie), 사이언티픽 인더스트리즈 인코퍼레이티드(Scientific Industries Inc.)) 상에서 15 ml 그라이너관에서 인큐베이션하였다. 이는 10 μM의 실시에 1의 화합물의 최종 농도에 상응한다. 대조 실험을 위해, 0.25% DMSO를 사용하였다.

[0374] 인큐베이션 단계 후 친화도 매트릭스 (고정화된 항체를 갖는 아미노링크® 수지; 면역침전 샘플당 100 μl 비드)를 이어서 4°C에서 1시간 동안 회전 진탕기 상에서 용해물 샘플과 함께 인큐베이션하였다. 비드를 2분 동안 2000 rpm에서 원심분리에 의해 수집하고, 소량의 비결합 분획을 유지시키고 잔류 상청액을 폐기하였다. 비드를 600 μl 용해 완충제 (DTT 없음)를 갖는 모비콜(Mobicol)-칼럼 (모비테크(MoBiTech), 10055)으로 옮기고, 0.2% NP40 세정제를 함유하는 10 ml 용해 완충제, 이어서 세정제 없이 5 ml 용해 완충제로 세척하였다. 결합 단백질을 용리시키기 위해, 80 μl 2 x SDS 샘플 완충제를 칼럼에 첨가하였다. 칼럼을 95°C에서 10분 동안 인큐베이션하고 용리액을 원심분리에 의해 실리콘화 마이크로퓨즈 관으로 옮겼다. 그 다음 단백질을 50 mM DTT로 환원시킨 후 108 mM 아이오도아세트아미드로 알킬화하였다. 그 다음 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 분리하였다.

3. 질량 분광법에 의한 단백질 확인

[0375] 3.1 질량 분광 분석 이전에 단백질 분해

[0376] 겔-분리된 단백질을 본질적으로 이전에 기재된 절차 (문헌 [Shevchenko et al., 1996, Anal. Chem. 68:850-858])에 따라 겔 내에서 분해시켰다. 간략하게, 겔-분리된 단백질을 청결한 수술용 메스(clean scalpel)를 사용하여 겔로부터 잘라내고, 100 μl의 5 mM 트리에틸암모늄 비카르보네이트 완충제 (TEAB; 시그마 T7408) 및 수 중 40% 에탄올을 사용하여 2회 오물을 제거하고, 무수 에탄올로 탈수하였다. 후속적으로 단백질을 5 mM TEAB 중 10 ng/ μl의 프로테아제 농도로 돼지 트립신 (프로메가(Promega))으로 겔 내 분해시켰다. 37°C에서 4시간 동안 분해를 진행시킨 후 5 μl의 5% 포름산을 사용하여 반응을 중지시켰다.

[0377] 3.2 질량 분광법에 의한 분석 이전에 샘플 제조

[0378] 겔 플러그를 20 μl의 1% 포름산으로 2회 및 아세토니트릴의 농도를 증가시키면서 3회 추출하였다. 후속적으로 추출물을 산성화된 분해물 상청액과 함께 모으고 진공 원심분리기에서 건조시켰다.

[0379] 3.3 웨티드 추출물의 iTRAQ 표지화

[0380] 200 μM의 프리 실시에 1로 처리된 샘플의 웨티드 추출물 및 용매 대조군 (0.5% DMSO)을 상이한 변형의 등압 태깅 시약 (iTRAQ 시약 멀티플렉스 키트, 부품 번호 4352135, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티)으로 처리하였다. iTRAQ 시약은 웨티드의 동시 확인 및 정량을 가능하게 하는, 4개 이하의 상이한 생물학적 샘플에서 아미노기 상에 웨티드를 표지화할 수 있는 한 세트의 다중화된, 아민-특이적, 안정한 동위원소 시약이다. iTRAQ 시약을 제조업체에 의해 제공된 사용설명서에 따라 사용하였다. 샘플을 10 μl의 50 mM TEAB 용액, pH 8.5에 재현탁시키고 10 μl 에탄올을 첨가하였다. iTRAQ 시약을 120 μl 에탄올에 용해시키고 10 μl의 시약 용액을 샘플에 첨가하였다. 표지화 반응을 수평 진탕기에서 1시간 동안 실온에서 수행하고 5 μl의 100 mM TEAB 및 수 중 100 mM 글리신을 첨가함으로써 중지시켰다. 그 다음 2개의 표지된 샘플을 합하고, 진공 원심분리기에서 건조시키고 수 중 0.1% 포름산 10 μl에 재현탁시켰다.

[0381] 3.4 질량 분광 데이터 획득

[0382] 웨티드 샘플을 써모 오르비트랩벨로스 질량 분광계에 직접 연결된 1D+, 엑시전트(Eksigent) 나노 LC 시스템에

주입하였다. 펩티드를 수성 및 유기 용매의 구배 (하기 참조)를 사용하여 LC 시스템 상에서 분리하였다. 용매 A는 0.1% 포름산이었고 용매 B는 0.1% 포름산 중 70% 아세토니트릴이었다.

표 14

LC 시스템의 펩티드 용리

시간 (분)	% A	% B
0	95	5
230	40	60
240	10	90
250	10	90
251	95	5
260	95	5

[0384]

3.5 단백질 확인 및 정량

[0386]

LC-MS/MS 실험에서 생성된 펩티드 질량 및 단편화 데이터를 사용하여 국제 단백질 지수 (IPI) 단백질 서열 데이터베이스의 디코이 버전(decoy version)과 조합된 상기 데이터베이스의 인-하우스(in-house) 큐레이트된 버전 (curated version)으로 이루어진 단백질 데이터 베이스를 정보검색하였다 (문헌 [Elias and Gygi, 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4, 207-214]). 측정된 펩티드 질량 및 단편화 데이터를 소프트웨어 툴 마스코트를 사용하여 데이터베이스에서 입력으로부터 산출된 데이터와 상호 연관시킴으로써 단백질을 확인하였다 (문헌 [Perkins et al., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567]). 마스코트 검색 파라미터는 20 ppm 펩티드 질량 허용치였다. 단편 질량 허용치 20 mmu. 효소 트립신. 고정 변형 iTRAQ (K). 가변 변형 iTRAQ (N-말단) & 아세틸 (N-말단) & 산화 (M) & 카르바미도메틸 (C) & 실시예 1의 화합물 (C). 최대 누락 절단(Max missed cleavage) 3. 단백질 허용 역치를 조정하여 디코이 데이터 베이스에 대해 적중률에 의해 제시된 바와 같이 1% 미만의 허위 발견율을 달성하였다 (문헌 [Elias and Gygi, 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4, 207-214]). 상대 단백질 정량은 본질적으로 선행 간행물 (문헌 [Bantscheff et al., 2007. *Nature Biotechnology* 25, 1035-1044])에 기재된 바와 같이 iTRAQ 리포터 이온 신호의 피크 영역을 사용하여 수행하였다.

[0387]

결과

[0388]

도 1은 인간 JAK3의 서열을 나타낸다. 펩티드 LVMEYLPSGCLR (JAK3 위치 900-911)은 실시예 1의 화합물에 의해 공유 변형된 유일한 펩티드이다. 이 펩티드는 시스테인 909에서 변형된다 (표 15 내지 17 참조).

표 15

펩티드 LVMEYLPSGCLR (JAK3 서열에서 아미노산 잔기 900 – 911)의 확인. 고정 변형 4TRAQ (K).
 가변 변형: 4TRAQ (N-말단), 아세틸 (단백질 N-말단), 카르바미도메틸 (C), 실시 예 1의 화합물 (C),
 산화 (M). 트립신에 의한 절단: 그 다음 잔기가 P가 아닌 경우 K 또는 R의 C-말단 즉 절단.

JAK3에서의 위치	관찰 질량	예상 질량	계산 질량	ppm	펩티드 서열
900-911	799.4131	1596.8117	1596.8126	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ (N-말단); 카르바미도메틸 (C); 산화 (M) (이온 스코어 29)
900-911	633.6586	1897.9539	1897.9565	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ (N-말단); 실시 예 1의 화합물 (C) (이온 스코어 33)
900-911	638.9905	1913.9495	1913.9514	0	R.LVMEYLPSGCLR.D 4TRAQ (N-말단); 실시 예 1의 화합물 (C); 산화 (M) (이온 스코어 35)

[0389]

표 16

iTRAQ-LVM(ox)EYLPSGC(카르바미도메틸)LR MS/MS 스펙트럼의
최고 이온 강도를 갖는 상부 40개의 피크

m/z	이온 강도	상대 강도	이온
115.107	381.8	4.48	iTRAQ
116.111	6769.6	79.51	iTRAQ
117.114	662.9	7.79	iTRAQ
145.109	3083.4	36.22	
175.119	580.7	6.82	y1
230.197	885.3	10.4	
258.194	1633.7	19.19	b1
326.961	424.6	4.99	
329.267	669.8	7.87	
340.999	766.1	9	
357.261	412.4	4.84	
402.145	397.1	4.66	
429.088	8513.7	100	잠금 매스
440.299	390.4	4.59	
444.331	564.9	6.64	
447.097	956.6	11.24	
569.338	464.6	5.46	
633.34	583.9	6.86	
672.315	1102.2	12.95	
673.32	553.5	6.5	
689.34	1439.5	16.91	y6
690.341	1046.5	12.29	
802.423	361.6	4.25	
803.441	345.9	4.06	
879.49	331.4	3.89	
965.49	535	6.28	
966.489	780.7	9.17	y8
1077.54	329	3.86	
1094.535	401.4	4.71	y9
1095.531	555.8	6.53	
1096.533	392.6	4.61	
1177.547	395.8	4.65	
1178.572	1767.3	20.76	y10
1234.62	352.4	4.14	
1276.628	424.4	4.98	y11
1277.64	1666.4	19.57	
1278.624	563.2	6.62	
1389.747	559.1	6.57	
1390.721	1760.9	20.68	[M+H - iTRAQ]
1391.733	473.2	5.56	

[0390]

표 17

iTRAQ-LVM(ox)EYLPSC(실시예 1)LR MS/MS 스펙트럼의
최고 이온 강도를 갖는 상부 40개의 피크

m/z	이온 강도	상대 강도	이온
115.107	3035.7	58.12	iTRAQ
116.111	936.9	17.94	iTRAQ
136.076	5223.1	100	
145.107	1095.1	20.97	
175.119	888.5	17.01	
230.195	480.1	9.19	
252.65	372.4	7.13	
258.191	1328.4	25.43	b1
285.174	492.4	9.43	
321.158	378.3	7.24	
340.987	334.7	6.41	
357.259	1715.5	32.85	
409.155	1177.8	22.55	
429.088	5148.8	98.58	잠금 매스
433.155	800	15.32	
440.297	838.7	16.06	
447.099	629.7	12.06	
503.743	639	12.23	
504.294	2309.4	44.21	b3
505.298	523	10.01	
569.34	1300.4	24.9	
570.341	504.3	9.66	
605.345	742.1	14.21	
622.232	529.6	10.14	
633.338	3013.1	57.69	
634.341	1088.4	20.84	
691.288	412.3	7.89	
732.405	306.7	5.87	
796.41	433.6	8.3	
805.358	304.8	5.83	
822.4	762.3	14.59	y4
909.426	2328.5	44.58	y5
910.429	1009.9	19.33	
911.428	311.6	5.97	
989.455	656.6	12.57	
990.454	546.8	10.47	
1006.479	4902.3	93.86	y6
1007.481	3551.7	68	
1008.481	642.4	12.3	
1119.566	408.2	7.81	y7

[0391]

도면

도면1

1 MAPPSEETPL IPQRSCSLLS TEAGALHVLL PARGPGPPQR LSFSFGDHIA
 51 EDLCVQAAKA SGILPVYHSL FALATEDLSC WFPPSHIFSV EDASTQVLLY
 101 RIRFYFPNWF GLEKCHRFGL RKDLASAILD LPVLEHLFAQ HRSDLVSGRL
 151 PVGLSLKEQG ECLSLAVLDL ARMAREQAQR PGELLKTVSY KACLPPSLRD
 201 LIQGLSFVTR RRIRRTVRRA LRRVAACQAD RHSLMAKYIM DLERLDPAGA
 251 AETFHVGLPG ALGGHDGLGL LRVAGDGGIA WTQGEQEVLQ PFCDFPEIVD
 301 ISIKQAPRVRG PAGEHRLVTV TRTDNQILEA EFPGLPEALS FVALVDGYFR
 351 LTTDSQHFFC KEVAPPRLL EVAEQCHGPI TLDFAINKLK TGGSRPGSYV
 401 LRRSPQDFDS FLLTVCVQNP LGPDYKGCLI RRSPTGTFL VGLSRPHSSL
 451 RELLATCWDG GLHVDGVAVT LTSCCIPRPK EKSNLIVVQR GHSPPTSSLV
 501 QPQSQYQLSQ MTFHKIPADS LEWHENLGHG SFTKIRGCR HEVVDGEARK
 551 TEVLLKVMDA KHKNCMESFL EAASLMSQVS YRHLVLLHGV CMAGDSTMVQ
 601 EFVHLGAIDM YLRKRGHLVP ASWKLQVVKQ LAYALNYLED KGLPHGNVSA
 651 RKVLLAREGA DGSPPFIKLS DPGVSPAVLS LEMLTDRIPW VAPECLREAQ
 701 TLSLEADKWG FGATVWEVFS GVTMPISALD PAKKLQFYED RQQLPAPKWT
 751 ELALLIQQCM AYEPVQRPSF RAVIRDLNSL ISSDYELSD PTPGALAPRD
 801 GLWNGAQLYA CQDPТИFEER HLKYISQLGK GNFGSVELCR YDPLGDNTGA
 851 LVAVKQLQHS GPDQQRDFQR EIQLKALHS DFIVKYRGVS YGPGRQSLRL
 901 VMEYLPSCGL RDFLQRHRAR LDASRLLLYS SQICKGMEYL GSRRCVHRDL
 951 AARNILVESE AHVKIADFGL AKLLPLDKDY YVVREPGQSP IFWYAPESLS
 1001 DNIFSRQSDV WSFGVVLYEL FTYCDKSCSP SAEFLRMMGC ERDVPALCRL
 1051 LELLEEGQRL PAPPACPAEV HELMKLCWAP SPQDRPSFSA LGPQLDMLWS
 1101 GSRCETHAF TAHPEGKHHS LSFS

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Cellzome Limited

<120> Pyrazolo[4,3-c]pyridine derivatives as kinase inhibitors

<130> CEL67811EP

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Pro Ser Glu Glu Thr Pro Leu Ile Pro Gln Arg Ser Cys

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser Thr Glu Ala Gly Ala Leu His Val Leu Leu Pro Ala

20 25 30

Arg Gly Pro Gly Pro Pro Gln Arg Leu Ser Phe Ser Phe Gly Asp His

35 40 45

Leu Ala Glu Asp Leu Cys Val Gln Ala Ala Lys Ala Ser Gly Ile Leu

50 55 60

Pro Val Tyr His Ser Leu Phe Ala Leu Ala Thr Glu Asp Leu Ser Cys

65 70 75 80

Trp Phe Pro Pro Ser His Ile Phe Ser Val Glu Asp Ala Ser Thr Gln

85 90 95

Val Leu Leu Tyr Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Pro Asn Trp Phe Gly Leu

100 105 110

Glu Lys Cys His Arg Phe Gly Leu Arg Lys Asp Leu Ala Ser Ala Ile

115 120 125

Leu Asp Leu Pro Val Leu Glu His Leu Phe Ala Gln His Arg Ser Asp

130 135 140

Leu Val Ser Gly Arg Leu Pro Val Gly Leu Ser Leu Lys Glu Gln Gly

145 150 155 160

Glu Cys Leu Ser Leu Ala Val Leu Asp Leu Ala Arg Met Ala Arg Glu

165 170 175

Gln Ala Gln Arg Pro Gly Glu Leu Leu Lys Thr Val Ser Tyr Lys Ala

180 185 190

Cys Leu Pro Pro Ser Leu Arg Asp Leu Ile Gln Gly Leu Ser Phe Val

195 200 205

Thr Arg Arg Arg Ile Arg Arg Thr Val Arg Arg Ala Leu Arg Arg Val

210 215 220

Ala Ala Cys Gln Ala Asp Arg His Ser Leu Met Ala Lys Tyr Ile Met

225 230 235 240

Asp Leu Glu Arg Leu Asp Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Phe His Val

245 250 255

Gly Leu Pro Gly Ala Leu Gly Gly His Asp Gly Leu Gly Leu Leu Arg

260 265 270

Val Ala Gly Asp Gly Gly Ile Ala Trp Thr Gln Gly Glu Gln Glu Val

275 280 285

Leu Gln Pro Phe Cys Asp Phe Pro Glu Ile Val Asp Ile Ser Ile Lys

290 295 300

Gln Ala Pro Arg Val Gly Pro Ala Gly Glu His Arg Leu Val Thr Val

305 310 315 320

Thr Arg Thr Asp Asn Gln Ile Leu Glu Ala Glu Phe Pro Gly Leu Pro

325 330 335

Glu Ala Leu Ser Phe Val Ala Leu Val Asp Gly Tyr Phe Arg Leu Thr

340 345 350

Thr Asp Ser Gln His Phe Phe Cys Lys Glu Val Ala Pro Pro Arg Leu

355 360 365

Leu Glu Glu Val Ala Glu Gln Cys His Gly Pro Ile Thr Leu Asp Phe

370 375 380

Ala Ile Asn Lys Leu Lys Thr Gly Gly Ser Arg Pro Gly Ser Tyr Val

385 390 395 400

Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Phe Asp Ser Phe Leu Leu Thr Val Cys

405 410 415

Val Gln Asn Pro Leu Gly Pro Asp Tyr Lys Gly Cys Leu Ile Arg Arg

420 425 430

Ser Pro Thr Gly Thr Phe Leu Leu Val Gly Leu Ser Arg Pro His Ser

435 440 445

Ser Leu Arg Glu Leu Leu Ala Thr Cys Trp Asp Gly Gly Leu His Val

450 455 460

Asp Gly Val Ala Val Thr Leu Thr Ser Cys Cys Ile Pro Arg Pro Lys

465 470 475 480

Glu Lys Ser Asn Leu Ile Val Val Gln Arg Gly His Ser Pro Pro Thr

485 490 495

Ser Ser Leu Val Gln Pro Gln Ser Gln Tyr Gln Leu Ser Gln Met Thr

500 505 510

Phe His Lys Ile Pro Ala Asp Ser Leu Glu Trp His Glu Asn Leu Gly

515 520 525

His Gly Ser Phe Thr Lys Ile Tyr Arg Gly Cys Arg His Glu Val Val

530 535 540

Asp Gly Glu Ala Arg Lys Thr Glu Val Leu Leu Lys Val Met Asp Ala

545 550 555 560

Lys His Lys Asn Cys Met Glu Ser Phe Leu Glu Ala Ala Ser Leu Met

565 570 575

Ser Gln Val Ser Tyr Arg His Leu Val Leu Leu His Gly Val Cys Met

580 585 590

Ala Gly Asp Ser Thr Met Val Gln Glu Phe Val His Leu Gly Ala Ile

595 600 605

Asp Met Tyr Leu Arg Lys Arg Gly His Leu Val Pro Ala Ser Trp Lys

610 615 620

Leu Gln Val Val Lys Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Asn Tyr Leu Glu Asp

625 630 635 640

Lys Gly Leu Pro His Gly Asn Val Ser Ala Arg Lys Val Leu Leu Ala

645 650 655

Arg Glu Gly Ala Asp Gly Ser Pro Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro

660 665 670

Gly Val Ser Pro Ala Val Leu Ser Leu Glu Met Leu Thr Asp Arg Ile

675 680 685

Pro Trp Val Ala Pro Glu Cys Leu Arg Glu Ala Gln Thr Leu Ser Leu

690 695 700

Glu Ala Asp Lys Trp Gly Phe Gly Ala Thr Val Trp Glu Val Phe Ser

705 710 715 720

Gly Val Thr Met Pro Ile Ser Ala Leu Asp Pro Ala Lys Lys Leu Gln

725 730 735

Phe Tyr Glu Asp Arg Gln Gln Leu Pro Ala Pro Lys Trp Thr Glu Leu

740 745 750

Ala Leu Leu Ile Gln Gln Cys Met Ala Tyr Glu Pro Val Gln Arg Pro

755 760 765

Ser Phe Arg Ala Val Ile Arg Asp Leu Asn Ser Leu Ile Ser Ser Asp

770 775 780

Tyr Glu Leu Leu Ser Asp Pro Thr Pro Gly Ala Leu Ala Pro Arg Asp

785 790 795 800

Gly Leu Trp Asn Gly Ala Gln Leu Tyr Ala Cys Gln Asp Pro Thr Ile

805 810 815

Phe Glu Glu Arg His Leu Lys Tyr Ile Ser Gln Leu Gly Lys Gly Asn

820 825 830

Phe Gly Ser Val Glu Leu Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Gly Asp Asn Thr

835 840 845

Gly Ala Leu Val Ala Val Lys Gln Leu Gln His Ser Gly Pro Asp Gln

850 855 860

Gln Arg Asp Phe Gln Arg Glu Ile Gln Ile Leu Lys Ala Leu His Ser

865 870 875 880

Asp Phe Ile Val Lys Tyr Arg Gly Val Ser Tyr Gly Pro Gly Arg Gln

885 890 895

Ser Leu Arg Leu Val Met Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Cys Leu Arg Asp

900 905 910

Phe Leu Gln Arg His Arg Ala Arg Leu Asp Ala Ser Arg Leu Leu Leu

915 920 925

Tyr Ser Ser Gln Ile Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Ser Arg Arg

930 935 940

Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Glu Ser Glu

945 950 955 960

Ala His Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu

965 970 975

Asp Lys Asp Tyr Tyr Val Val Arg Glu Pro Gly Gln Ser Pro Ile Phe

980 985 990

Trp Tyr Ala Pro Glu Ser Leu Ser Asp Asn Ile Phe Ser Arg Gln Ser

995 1000 1005

Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr

1010	1015	1020
Cys Asp Lys Ser Cys Ser Pro Ser Ala Glu Phe Leu Arg Met Met		
1025	1030	1035
Gly Cys Glu Arg Asp Val Pro Ala Leu Cys Arg Leu Leu Glu Leu		
1040	1045	1050
Leu Glu Glu Gly Gln Arg Leu Pro Ala Pro Pro Ala Cys Pro Ala		
1055	1060	1065
Glu Val His Glu Leu Met Lys Leu Cys Trp Ala Pro Ser Pro Gln		
1070	1075	1080
Asp Arg Pro Ser Phe Ser Ala Leu Gly Pro Gln Leu Asp Met Leu		
1085	1090	1095
Trp Ser Gly Ser Arg Gly Cys Glu Thr His Ala Phe Thr Ala His		
1100	1105	1110
Pro Glu Gly Lys His His Ser Leu Ser Phe Ser		
1115	1120	