



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0136323
(43) 공개일자 2016년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/497* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/497 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7026668

(22) 출원일자(국제) 2015년02월27일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2016년09월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/017963

(87) 국제공개번호 WO 2015/131031
국제공개일자 2015년09월03일

(30) 우선권주장
61/946,124 2014년02월28일 미국(US)

(71) 출원인
인사이트 코포레이션
미국 브리검주 19803 월밍تون 어거스틴 컷-오프
1801

(72) 발명자
바디 크리쉬나
미국 펜실베이니아주 19348 케네트 스퀘어 포레스
트 드라이브 108

(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 골수형성이상증후군 치료용 JAK1 억제제

(57) 요 약

본 발명은 JAK1 선택적 억제제, 특히 피롤로[2,3-d]페리미딘 및 피롤로[2,3-b]페리딘 유도체, 및 골수형성이상증후군 (MDS)의 치료에 있어서의 이들의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

Y10S 514/908 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

골수형성이상증후군의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자의 골수형성이상증후군을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 JAK1 선택적 억제제는 JAK2, JAK3 및 TYK2에 비해 JAK1에 선택적인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 JAK1 선택적 억제제는,

3-[1-(6-클로로페리딘-2-일)페롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴;

3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴;

4-[(4-{3-시아노-2-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로필}페페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴;

4-[(4-{3-시아노-2-[3-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페롤-1-일]프로필}페페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴;

{1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]페페리딘-4-일}-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]페페리딘-1-카르복스아미드;

[3-{4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일}-1-{1-{[2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]카르보닐}페페리딘-4-일}아제티딘-3-일]아세토니트릴;

[트랜스-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]-3-(4-{[2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]카르보닐}페페라진-1-일)사이클로부틸]아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-{(3-하이드록시아제티딘-1-일)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-{[(2S)-2-(하이드록시메틸)페롤리딘-1-일]메틸]-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-{[(2R)-2-(하이드록시메틸)페롤리딘-1-일]메틸]-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴;

4-(4-{3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페녹시}페페리딘-1-일)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]부탄니트릴;

5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필페라진-2-카르복스아미드;

4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드;

5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1H-페롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필페라진-2-카르복스아미드;

{1-(시스-4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

{1-(시스-4-{[4-[(에틸아미노)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

{1-(시스-4-{[4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

{1-(시스-4-{[4-{[(3R)-3-하이드록시파롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

{1-(시스-4-{[4-{[(3S)-3-하이드록시파롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-((1S)-2-하이드록시-1-메틸에틸)아미노]메틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-((2R)-2-하이드록시프로필)아미노]메틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴;

{트랜스-3-(4-{[4-((2S)-2-하이드록시프로필)아미노]메틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴; 또는

이의 약제학적으로 허용가능한 염 중에서 선택되는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 단일계열 형성이상 불응성 혈구감소증 (refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RCUD)인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 환상 철적모구 불응성 빈혈 (refractory anemia with ring sideroblasts; RARS)인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 다계열 형성이상 불응성 혈구감소증 (refractory cytopenia with multilineage dysplasia)인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 과다 모세포 불응성 빈혈-1 (refractory anemia with excess blasts-1; RAEB-1)인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 과다 모세포 불응성 빈혈-2 (refractory anemia with excess blasts-2; RAEB-2)인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 미분류 골수형성이상증후군 (myelodysplastic syndrome, unclassified; MDS-U)인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 5q 단독결손 골수형성이상증후군

(myelodysplastic syndrome associated with isolated del(5q))인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 골수형성이상증후군은 적혈구 생성 촉진제에 불응성인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 적혈구 수혈 의존성인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, IMiD, 항IL-6 제제, 항TNF- α 제제, 저메틸화제 또는 생물학적 반응 조절제 (BRM) 중에서 선택되는 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항TNF- α 제제는 인플릭시맙 및 에타네르셉트 중에서 선택되는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 저메틸화제는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 억제제인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 DNA 메틸트랜스퍼라아제 억제제는 5-아자시티딘 및 데시타빈 중에서 선택되는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 IMiD는 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, CC-11006 및 CC-10015 중에서 선택되는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항흉선세포글로불린, 재조합 인간 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-단핵구 CSF (GM-CSF), 적혈구 생성 촉진제 (ESA) 및 사이클로스포린 중에서 선택되는 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본원은 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, 2014년 2월 28일자로 출원된 미국 가출원 제61/946,124호에 대한 우선권 이익을 주장한다.

[0002]

본 발명은 JAK1 선택적 억제제 및 골수형성이상증후군 (MDS)의 치료에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

이전에는 골수조혈이형성 증후군 또는 전백혈병으로 알려진 골수형성이상증후군 (MDS)은 하나 이상의 주요 골수 세포 계통에 대한 무효조혈을 특징으로 하는 이질적인 클론성 조혈 질환이다. 골수형성이상증후군은 골수 부전, 말초 혈구감소증 및 급성 골수성 백혈병 (AML)으로 진행되는 경향을 동반한다. 게다가, 클론성 세포 유전학적 이상은 약 50%의 MDS 증례에서 발견될 수 있다. 모집단에서, MDS는 100,000명 중 5명에서 발생되고, 발생률은 연령에 따라 증가하며, 70세 이상의 사람에서는 100,000명 중 약 22 내지 45명에 이른다 (Greenberg, "The myelodysplastic syndromes" in Hoffman, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice (3rd ed.), Churchill Livingston; 2000:1106-1129; Liesveld and Lichtman, Chapter 88. "Myelodysplastic Syndromes (Clonal Cytopenias and Oligoblastic Myelogenous Leukemia)", in Prchal et al, eds. Williams Hematology. 8th ed., New York: McGraw-Hill; 2010). 본 발명자들의 MDS의 병태생리에 대한 과학적 지식의 진보에도 불구하고, 특히 병에 걸린 환자에게 조혈 줄기세포 이식 (HSCT)이 금기시 된 경우에, 이용가능한 치료 대안 (therapeutic option)은 거의 없으며, 대부분 일시적으로 완화된다.

[0004]

MDS의 표준 치료에는 관찰 및 임상 모니터링, 심리사회적 지지 및 QOL의 개선 노력을 수반하는 지지 요법이 포함된다 (Cheson, et al, *Blood* 2000;96:3671–3674; Venugopal et al. *Cancer Treat Res* 2001;108:257–265; Greenberg, *Int J Ped Hem-Onc* 1997;4:231–238). 또한, 증후성 빈혈을 위한 RBC 수혈 및 혈소판 감소증의 출혈 증상을 위한 혈소판 수혈이 필요하다. RBC 수혈을 필요로 하는 골수형성이상증후군 환자는 수혈 횟수 증가를 요하는 동종 항체의 발현, 및 혈청 폐리틴을 < 1000 µg/L로 유지하기 위해 철 칼레이트화를 요하는 간, 심장 및 내분비 기관에 대한 말단 기관 장애로 인한 철 부하를 비롯한 합병증을 일으킬 수 있다 (Venugopal et al 2001 (상기 참조), Greenberg 1997 (상기 참조)). 불응성 증후성 혈구감소증의 증례에 있어서, 조혈 사이토카인 지원 (support), 예컨대 감염 합병증을 수반한 호중구 MDS에 대해서는 재조합 인간 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF) 또는 과립구-단핵구 CSF (GM-CSF), 및 증후성 빈혈에 대해서는 적혈구 생성 촉진제 (ESA)의 사용이 요구된다 (Cheson et al 2000 (상기 참조), Jädersten et al, *Blood* 2005;106:803–811; Schiffer, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:205–210). 초기 단계 MDS, 즉, IPSS 저 위험군 및 IPSS 중간-1 위험군에서, 증후성 빈혈이 치료적 개입을 요하는 가장 일반적인 원인이다. ESA는 이들 환자 중 일부에게만 도움이 되며, RBC 수혈 의존성을 보이지 않는 환자 또는 내인성 EPO 레벨이 낮은 (< 500 IU) 환자에게서 최대 반응을 나타낸다 (Cheson et al 2000 (상기 참조), Jädersten et al 2005 (상기 참조), Schiffer 2006 (상기 참조), Fenaux, et al., *Lancet Oncol* 2009;10:223–232). 결국은, 환자는 ESA 치료에 반응하지 않게 되며, RBC 수혈을 필요로 하고 항상 적혈구수가 낮은 경우에도 ESA가 통상 계속 이어지더라도, RBC 수혈 지원을 요한다. 수혈 필요량은 달라질 수 있으며, 이는 높은 Hgb 레벨을 요하는 수반되는 의학적인 문제, 예컨대 협심증, RBC 동종 항체의 발생, 비종, 및 혈소판 감소증 또는 혈소판 기능 장애로 인한 잠재성 소화관 출혈에 의해 영향을 받을 수 있다 (Venugopal et al 2001 (상기 참조), Greenberg 1997 (상기 참조), Fenaux et al 2009 (상기 참조)).

[0005]

저강도 요법에는 저강도 화학요법 또는 생물학적 반응 조절제 (BRM)를 사용하는 것이 포함된다. 저메틸화제, 예컨대 DNA 메틸트랜스퍼라아제 억제제인 5-아자시티딘 및 데시타빈 (5-아자-2'-데옥시시티딘)은 무작위 제3상 시험에서 백혈병성 형질전환의 위험성을 저하시키고, 소정 비율의 환자에 있어서 전체 생존율을 개선시키는 것으로 증명되었다 (Fenaux et al 2009 (상기 참조), Silverman, *J Clin Oncol* 2002;20:2429–2440; Silverman, *J Clin Oncol* 2006;24:3895–3903). 유사하게는, 데시타빈은 중간 위험군 및 고 위험군 질환의 MDS 환자의 질환 반응률, 관해지속기간, AML 진행까지의 기간 및 생존율이 큰 것으로 입증되었다. 게다가, 데시타빈은 피로 및 신체 기능의 측면에 대한 환자 보고 QOL (EORTC (The European Organisation for Research and Treatment of Cancer) [EORTC QLQ C30]에 근거함)에서 유의한 개선을 나타내는 것으로 입증되었다 (Kantarjian, et al., *Cancer* 2006;106:1794–1803; Lübbert, et al., *Br J Haematol* 2001;114:349–357; Lübbert et al., *J Clin Oncol* 2011;29:1987–1996). 5-아자시티딘 및 데시타빈은 MDS 치료용으로 승인되어 있고, 특히 임상적 유효성 (clinical benefit)을 나타내며, IPSS 중간 2 위험군 및 고 위험군 MDS의 환자에 대하여 NCCN MDS 패널에 의해 권장된다 (National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Myelodysplastic Syndromes Guidelines Version 1. 2012. www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp).

[0006]

염증 분자는 MDS에 있어서의 조혈 전구세포의 증식 및 아포포토시스를 추진시키는 조절 큐 (regulatory cue)로서 관여해왔다. 조혈모세포/전구세포 (HSPC) 및 BM 미세환경의 노화 의존적 변화와 관련된 만성 면역 자극은 질환의 병인에 결정적인 역할을 하는 것으로 여겨진다. 조혈 노화 및 MDS의 병리학적 작용 (pathobiology)에 있어서의 선천성 면역 시그널링의 활성화를 시사하는 증거가 늘고 있다 (Chen et al., 2014). 이로써, T 세포 억제제, 예컨대 항흉선세포글로불린 (ATG), 사이클로스포린, 및 탈리도마이드 및 이의 유사체 레날리도마이드 (Molldrem, et al., *Br J Haematol* 1997;99:699–705; Sloand, et al., *J Clin Oncol* 2008;26:2505–2511; Raza, et al., *Blood* 2008;111:86–93; Fenaux, et al., *Blood* 2011;118:3765–3776; List, et al., *N Engl J Med* 2005;352:549–557)를 포함하는 면역조절물질이 MDS의 저강도 제제로서 사용된다. MDS의 고강도 요법에는 AML 및 HSCT를 치료하는데 사용되는 바와 같이, 집중 유도 화학요법이 포함된다. 다양한 집중 화학요법은 질환의 자연사를 변화시킬 가능성이 있기 때문에 테스트되어 왔으며; 이러한 접근법은 연구 단계에 있고, 고 위험군 질환의 MDS 환자에게 고 위험군 질환의 MDS 환자에게 실현가능한 대안이다. MDS의 유일한 치료 처치법으로, 바람직하게는 일치하는 형제자매 공여자로부터의 동종 HSCT는 고 위험군 MDS 환자에게 바람직한 대안이나, 적합한 공여자의 부재 및 고령과 관련된 동반질환으로 인해, 종종 이들 환자에 대하여 이러한 치료를 행하는 것이 불가능하게 된다 (NCCN 2012 (상기 참조); Larson, *Best Pract Res Clin Hematol* 2006;19:293–300; Schiffer, *Best Pract Res Clin Hematol* 2007;20:49–55).

[0007]

따라서, 골수형성이상증후군의 치료에 대한 새로운 치료법을 개발할 필요가 있다. 본원은 이러한 필요성 등에

대처하고자 한다.

발명의 내용

- [0008] 본원은 골수형성이상증후군 (MDS)의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자의 골수형성이상증후군 (MDS)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0009] 본원은 또한 골수형성이상증후군의 치료를 필요로 하는 환자의 골수형성이상증후군 치료를 위한 JAK1 선택적 억제제를 제공한다.
- [0010] 본원은 또한 골수형성이상증후군의 치료를 필요로 하는 환자의 골수형성이상증후군 치료용 약제의 제조를 위한 JAK1 선택적 억제제의 용도를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본원에 기재된 방법은 JAK1 선택적 억제제를 사용한다. JAK1 선택적 억제제는 다른 야누스 키나제와 비교하여 JAK1 활성을 우선적으로 억제하는 화합물이다. JAK1은 조절 이상 시에, 병태를 유발하거나 이의 한 원인이 될 수 있는 다수의 사이토카인 및 성장인자 시그널링 경로에 있어서 중심적인 역할을 한다. 예를 들어, IL-6 레벨은 류머티스성 관절염에서 증가되는데, 이는 질환에 악영향을 미치는 것을 시사한다 (Funesca, et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). IL-6이 적어도 부분적으로 JAK1을 통해 신호를 보내기 때문에, JAK1 억제를 통해 IL-6을 직접적 또는 간접적으로 길항하는 것은 임상적 유효성을 나타내는 것으로 예상된다 (Guschin, et al. *Embo J* 14:1421, 1995; Smolen, et al. *Lancet* 371:987, 2008). 게다가, 일부의 암에서 JAK1은 돌연변이되어, 바람직하지 않은 구성적 종양 세포 증식 및 생존을 초래한다 (Mullighan, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9414-8, 2009; Flex, *J Exp Med.* 205:751-8, 2008). 다른 자가면역질환 및 암에서, JAK1을 활성화시키는 염증성 사이토카인의 전신성 레벨 상승도 상기 질환 및/또는 관련 증상의 한 원인이 될 수 있다. 따라서, 이러한 질환의 환자는 JAK1 억제에 의해 혜택을 받을 수 있다. JAK1 선택적 억제제는 다른 JAK 키나제를 억제하는 불필요하고도 바람직하지 않은 잠재적인 영향을 피함과 동시에 효과적일 수 있다.
- [0012] JAK1 선택적 억제제는 다른 JAK 키나제와 비교하여, 덜 선택적 억제제에 비해 많은 치료상 이점이 있을 수 있다. JAK2에 대한 선택성에 관해서는, 다수의 중요한 사이토카인 및 성장인자는 예를 들어, 에리트로포이에틴 (Epo) 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 비롯한 JAK2를 통해 신호를 보낸다 (Parganas, et al. *Cell*, 93:385-95, 1998). Epo가 적혈구 생성을 위한 중요한 성장인자이므로, Epo 의존성 시그널링 부족으로 인해 적혈구수의 감소 및 빈혈을 초래할 수 있다 (Kaushansky, *NEJM* 354:2034-45, 2006). JAK2 의존성 성장인자의 또 하나의 예인 Tpo는 거핵구의 증식 및 성숙을 조절하는데 중심적인 역할을 하며 – 혈소판이 거핵구로부터 생성된다 (Kaushansky, *NEJM* 354:2034-45, 2006). 이로써, Tpo 시그널링 감소에 의해, 거핵구수가 감소되고 (거핵구 감소증), 순환 혈소판수가 저하될 것이다 (혈소판 감소증). 이때문에, 바람직하지 않고/않거나 제어할 수 없는 출혈을 초래할 수 있다. 다른 JAK, 예컨대 JAK3 및 Tyk2의 억제를 감소시키는 것도 이러한 키나제의 기능 버전 결손 인간이 다수의 질병, 예컨대 중증복합면역결핍증 또는 고면역글로불린 E 증후군 (고 IgE 증후군)에 걸리는 것으로 나타났기 때문에 바람직할 수 있다 (Minegishi, et al. *Immunity* 25:745-55, 2006; Macchi, et al. *Nature*, 377:65-8, 1995). 따라서, 다른 JAK에 대한 친화성이 저하된 JAK1 억제제는 면역 억제, 빈혈 및 혈소판 감소증을 수반한 부작용 경감에 대하여 덜 선택적 억제제에 비해 큰 이점을 나타낼 것이다.

- [0013] 염증성 사이토카인은 MDS의 병인에 중요한 역할을 하며, 혈구감소증 및 이형성 조혈 (dysplastic hematopoiesis)을 일으킨다. 이러한 염증성 사이토카인의 활성을 억제하여, 정상 조혈을 촉진시키고, 골수 전구세포를 조기 아포프토시스로부터 구하는 것으로 가정한다. 염증성 사이토카인은 리간드 매개 수용체 이량체화 및 인산전이/자기인산화로부터의 JAK를 병렬하는 것을 포함하는 JAK 활성화에 의해 다운스트림 효과를 조절한다. JAK1과 JAK2, 또는 JAK1과 JAK3으로 구성되는 얻어진 JAK 혜테로 이량체는 시그널을 전달하고, 이러한 사이토카인의 세포 반응을 매개한다. 게다가, JAK2 만으로 구성되는 JAK 호모 이량체는 골수 성장인자, 예컨대 적혈구 생성의 자극에 관여하는 EPO 및 혈소판 생성의 자극에 관여하는 TPO로부터의 시그널을 전달한다. 따라서, 선택적 JAK1 억제제는 JAK2 매개 적혈구 생성 및 혈소판 생성을 억제하지 않고서 염증성 사이토카인 시그널링의 폐지를 일으켜서, 정상 조혈의 회복 및 골수 혈구감소증의 완화를 가져올 것이다.

- [0014] 본 발명자들의 MDS의 병태생리에 대한 과학적 지식의 진보에도 불구하고, 특히 병에 걸린 환자에게 HSCT가 금기시 된 경우에, 이용가능한 치료 대안은 거의 없으며, 대부분 일시적으로 완화된다. MDS가 클론 질환임을 많은

연구가 나타내고 있으며, 증식된 클론이 골수에서의 조혈 전구세포의 과잉 증식의 결과인 것으로 입증되었다. 말초 혈구감소증을 초래하는 골수의 과잉 증식성 상태의 패러독스가 연구조사되었으며, 과잉량의 조혈세포의 척수내 프로그램 세포사 또는 아포프토시스가 있는 것으로 나타났다. 이러한 아포프토시스가 모든 FAB 카테고리의 환자에서 나타났으나, 모구수 (blast count)가 증가된 환자에서 감소되었다. 클론 집단이 점점 아포프토시스에 대하여 내성을 가지게 되고, 정상 조혈전구세포보다 증식상 유리하므로, 모구수 증가 및 AML로의 진행에 이르는 것으로 나타났다. 또한 과잉 아포프토시스가 주로, MDS 환자의 골수에서 과잉발현되는 다수의 전염증성 사이토카인에 의해 매개되는 것으로 드러났다. MDS의 병리학적 작용에 관여하는 사이토카인에는 종양피사인자 알파 (TNF- α), 인터페론 감마 (IFN γ) 및 IL 1 β 가 포함된다. TNF- α 인 전형적인 아포프토시스 촉진 (proapoptotic) 사이토카인의 고 혈장중 농도가 MDS 환자의 말초혈액 및 골수에서 관찰되었으며, TNF 수용체 및 메신저 리보핵산 (mRNA)의 고 발현이 MDS 환자로부터 유래된 골수 단핵세포에서 관찰되었다. 유사하게는, IFN γ 및 IL 1 β 의 증가가 MDS 골수 단핵세포에서 발견되고 있으며, IL-1 β 가 MDS로부터 AML로의 진행에 관여하고 있다. IL-1 β 는 GM-CSF 및 IL-3을 자극하기 때문에 조혈세포에 대하여 다양한 조절 작용을 나타내는 반면에, 염증 상태에서 보이는 바와 같이 고 농도에서 TNF α 및 프로스타글란딘 E2의 유도에 의해 조혈 억제를 초래하며, 후자는 골수줄기세포 증식의 강력한 억제유전자이다. 또한, 고 레벨의 IL-6, 섬유아세포 성장인자, 간세포 성장인자 및 형질전환 성장인자 β 는 MDS 환자의 골수세포에서 발견되고 있다. 게다가, 정상 조혈세포 증식 및 성숙을 억제하는 사이토카인 그 자체는 진행하는 이상 클론에 대하여 이러한 아포프토시스 촉진 효과를 발휘하지 못하므로, 이러한 이상 세포의 선택적 증식을 초래한다. 이러한 전염증성 사이토카인의 공급원이 통상적으로 정상 조혈세포를 양육하여 증식 및 분화시키는 변화된 골수 미세환경이며, 또한 면역조절세포의 침윤 및 MDS의 병리학적 작용에 기여하는 혈관형성의 원인될 수 있다는 증거가 있다 (Raza, et al., *Blood* 1995;86:268-276; Raza, et al., *Int J Hematol* 1996a;63:265-278; Raza, et al., *Leuk Res* 1996b;20:881-890; Mundle, et al. *Am J Hematol* 1999;60:36-47; Claessens, et al., *Blood* 2002;99:1594-1601).

[0015] 사이토카인 매개 전염증성 상태가 MDS의 병인에 관여한다는 개념으로부터, 분화 조혈세포를 조기 아포프토시스로부터 보호하여 MDS에서의 혈구감소증을 개선시키는 신규 치료법의 항사이토카인 요법에 이르게 되었다. 탈리도마이드 및 이의 유사체인 레날리도마이드, 인플릭시맙, 및 에타네르셉트와 같은 항TNF- α 제제가 MDS 환자의 혈구감소증을 개선시키는데 효과적인 것으로 입증되었다 (NCCN 2012 (상기 참조), Larson 2006 (상기 참조), Schiffner 2007(상기 참조)). 14명의 MDS 환자의 연구에서, 에타네르셉트가 12.5%의 평가가능 환자에서 혈소판 수 및 ANC의 개선과 함께, 25%의 환자에서 적혈구의 혈액학적 개선을 나타내었다. 게다가, 간헐적으로 에타네르셉트를 ATG와 배합하였더니, 보다 높은 적혈구의 혈액학적 개선을 가져왔고, 수혈을 요하는 14명의 MDS 환자 중 5명은 RBC 및 혈소판 수혈 비의존적이 되었으며, 2년 넘게 지속되었다. MDS에서의 탈리도마이드의 조사 연구에서, 등록된 83명의 환자 중, 51명은 12주간의 요법을 완료하였으며, 16명의 환자는 혈액학적 개선을 나타내었고, 10명의 이전에 수혈 의존성 환자는 수혈 비의존적이 되고, 대부분의 응답자는 IPSS 저 위험군 또는 중간 1 위험군 카테고리에 속하였다 (NCCN 2012 (상기 참조)). 게다가, 특히 모세포 (blast) 비율이 높은 고 위험군 가테고리의 환자에 대해서는 치료를 조기에 중단하는 경향이 있었다. 전염증성 사이토카인 작용을 억제하기 위한 또 하나의 접근법은 이의 세포 반응을 억제하는 것이다. 상당수의 사이토카인 및 성장인자 수용체는 세포외 리간드 결합을 전사 인자 STAT 시그널링을 통해 세포 반응으로 전달하도록 비수용체 TYK의 JAK 패밀리를 이용한다.

[0016] JAK의 4개의 구성원이 있다: JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2. JAK는 사이토카인 및 성장인자 수용체와 구성적으로 결합되어, 리간드 유도된 수용체 이량체화의 직접적인 결과로서 활성화되었으며, JAK 활성화는 JAK의 후속 병렬과, JAK 촉매 도메인의 활성화 루프에 발견된 보존 티로신의 인산전이/자기인산화 시에 일어난다. 이러한 티로신의 인산화 시에, JAK는 고 활성 상태에 들어간 다음에, 사이토카인 수용체의 특정 티로신 잔기를 인산화할 수 있으며, 이는 STAT 단백질을 비롯한 다수의 단백질의 도킹 부위로서 작용한다. JAK는 STAT 활성화와 관련된 주요한 키나제 패밀리이다. 활성화된 STAT는 세포핵으로 이행하며, 여기서 전사 인자로서 기능하고, 세포 활성화, 국소화, 생존 및 증식에 중요한 동의유전자의 발현을 추진한다.

[0017] 룩솔리티닙, JAK1 및 JAK2 억제제는 골수섬유증 환자의 비장 크기를 현저하게 축소시키고 증상을 개선시키는 것으로 입증되었다. 이러한 개선은 JAK2의 V617F 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 대상에서 분명히 드러났으며, 전염증성 사이토카인의 억제와 관련이 있을 것이다. 룩솔리티닙을 사용하여 관찰된 주요 유해사상 (AE)은 혈소판 감소증 및 빈혈이고; 두가지 모두 드물게는 이중 맹검 위약 대조 제3상 시험에서 시험 중단의 원인이었으며, 두 가지 모두 적어도 부분적으로 JAK2 매개 골수억제로 인한 것이다. 따라서, JAK1의 선택적 억제가 MDS 환자의 전염증성 사이토카인을 억제하는 유익한 효과를 가져오며, 조혈 전구세포의 조기 아포프토시스로 인한 혈구감소증을 개선시킬 것으로 가정한다. 게다가, JAK2 활성 보존은 조혈 사이토카인, 즉 EPO 및 TPO의 생리적 활성을

가능하게 하여, 정상 조혈세포의 생리적 증식 및 분화를 가능하게 할 것이다.

[0018] 또한, 철 과잉 (iron overload)은 MDS 환자에서 자주 발생하며, 최근 데이터는 전체 생존율 및 무백혈병 생존율에 대한 영향을 시사하고 있다. 철 항상성을 조절하는 최근에 발견된 주요 호르몬인 헵시딘의 변경된 제법이 이러한 점에 관여할 수 있으며, IL-6와 같은 염증성 사이토카인에 의해 조절될 수 있음을 전제로 하였다. 최근에 MDS에서 헵시딘 및 CRP가 통상적인 염증 마커로서 증가되는 것으로 나타났다 (Santini, et al., *PLoS One*, 6(8), e23109, pages 1-8 (2011)). 이러한 데이터는 JAK 억제가 CRP 및 헵시딘 레벨을 감소시킬 수 있어서, MDS에서 발생하는 염증 및 철 과잉을 역전시킬 수 있음을 시사한다.

[0019] 따라서, 본원은 그 중에서 특히, 골수형성이상증후군의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료적 유효량의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자의 골수형성이상증후군을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 사용되는 골수형성이상증후군은 2008년에 세계보건기구 (World Health Organization)가 제안한 MDS 분류를 지칭한다 (예를 들어, 표 1 참조). 특히, 1997년에, 세계보건기구 (WHO)는 SH (Society for Hematopathology) 및 EAHP (European Association of Hematopathology)와 협력하여, 조혈계 종양에 관한 새로운 분류법을 제안하였다 (Harris, et al., *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849; Vardiman, et al., *Blood* 2002;100:2292-2302). MDS의 경우, WHO는 FAB (French-American-British) 분류법의 형태학적 기준을 이용할 뿐만 아니라, 이용가능한 유전적, 생물학적 및 임상적 특징을 통합하여, MDS의 서브세트를 정의하였다 (Bennett, et al., *Br J Haematol* 1982;51:189-199). 2008년에는, 새로운 임상 및 과학 정보를 통합하여 단일계열 형성이상에 대한 정확한 예후 관련 하위분류를 가능하게 하도록 MDS의 WHO 분류 (표 1)를 더욱 세분화하였다 (Vardiman, et al., *Blood* 2009;114:937-951; Swerdlow, et al., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. Lyon France: IARC Press; 2008:88-103; Bunning and Germing, "Myelodysplastic syndromes/neoplasms" in Chapter 5, Swerdlow, et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (ed. 4th edition): Lyon, France: IARC Press;2008:88-103).

[표 1]

2008년도 신골수형성이상증후군의 WHO 분류

아형	혈액	골수
단일계열 형성이상 불응성 혈구감소증 (refractory cytopenia with unilineage dysplasia; RCUD)	단일 또는 이혈구감소증	하나의 세포주에서의 형성이상 $\geq 10\%$, $< 5\%$ 모세포
환상 절적모구 불응성 빈혈 (refractory anemia with ring sideroblast (RARS))	빈혈, 모세포 없음	$\geq 15\%$ 환상 절적모구가 있는 적혈구 전구세포, 다만 적혈구 형성이상, $< 5\%$ 모세포
다계열 형성이상 불응성 혈구감소증 (refractory cytopenia with multilineage dysplasia)	혈구감소증, $< 1 \times 10^9/L$ 단핵구	≥ 2 조혈계 세포에서의 형성이상 $\geq 10\%$, $\pm 15\%$ 환상 절적모구, $< 5\%$ 모세포
과다 모세포 불응성 빈혈-1 (RAEB-1)	혈구감소증, $\leq 2\% - 4\%$ 모세포, $< 1 \times 10^9/L$ 단핵구	단일계열 또는 다계열 형성이상, 아우어 소체 (Auer rod) 없음, $5\% - 9\%$ 모세포
과다 모세포 불응성 빈혈-2 (RAEB-2)	혈구감소증, $\leq 5\% - 19\%$ 모세포, $< 1 \times 10^9/L$ 단핵구	단일계열 또는 다계열 형성이상, \pm 아우어 소체, $10\% - 19\%$ 모세포
미분류 골수형성이상증후군 (MDS-U)	혈구감소증	단일계열 형성이상이거나 형성이상이 없으나, 특징적인 MDS 세포 유전학적 이상이 있음, $< 5\%$ 모세포
5q 단독결손 MDS (MDS associated with isolated del(5q))	빈혈, 정상 또는 증가된 혈소판수	단일계열 적혈구 5q 단독결손 (isolated del(5q)), $< 5\%$ 모세포

[0021] [0022] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 JAK2, JAK3 및 TYK2에 비해 JAK1에 선택적이다. 예를 들어, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 JAK2, JAK3 및 TYK2 중 하나 이상과 비교하여 JAK1을 선택적으로 억제한다. 일부 실시 형태에서, 상기 화합물은 JAK2와 비교하여 JAK1을 선택적으로 억제한다 (예를 들어, JAK1/JAK2 IC₅₀ 비 > 1). 일부 실시 형태에서, 상기 화합물 또는 염은 JAK2에 비해 JAK1에 약 10배 더 선택적이다. 일부 실시 형태에서, 상기 화합물 또는 염은 1 mM ATP에서 IC₅₀를 측정하여 계산된 것으로, JAK2에 비해 JAK1에 약 3배, 약 5배, 약 10배, 약 15배 또는 약 20배 더 선택적이다 (예를 들어, 실시예 A 참조).

[0023] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 표 2의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이다.

[0024]

[표 2]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
1 ^a	3-[1-(6-클로로페리딘-2-일)페롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴		+	>10
2	3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴		+	>10
3	4-[(4-(3-시아노-2-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로필)페페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조나트릴		+	>10
4	4-[(4-(3-시아노-2-[3-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페롤-1-일]프로필)페페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조나트릴		+	>10

[0025]

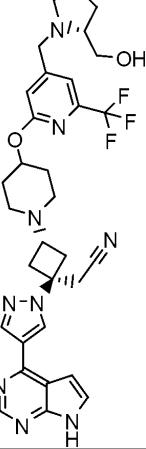
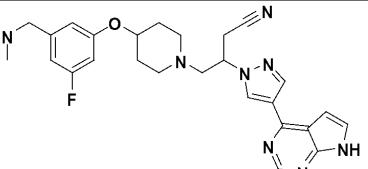
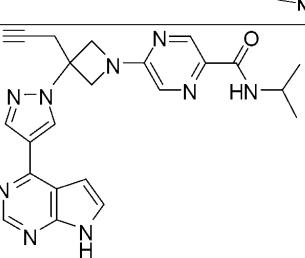
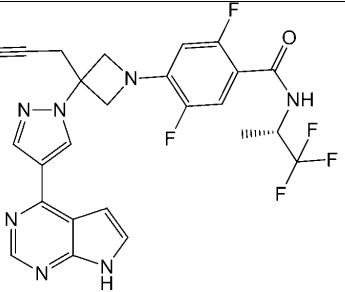
[0026]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
7	[3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]-1-(1-{{[2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]카르보닐}페페리딘-4-일)아제티딘-3-일]아세토니트릴		+	>10
8	[트랜스-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]-3-(4-{{[2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]카르보닐}페페라진-1-일)사이클로부틸]아세토니트릴		+	>10

[0027]

제조된 실시예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
9	{트랜스-3-(4-{{4-[3-하이드록시아제티딘-1-일]메틸]-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10
10	{트랜스-3-(4-{{4-[(2S)-2-(하이드록시메틸)페롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10

[0028]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
11	{트랜스-3-(4-{{[2R]-2-(하이드록시메틸)파롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10
12 ^b	4-(4-{{[다이메틸아미노]메틸}-5-플루오로페녹시}파페리딘-1-일)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]부탄니트릴		+	>10
13	5-{{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필파라진-2-카르복스아미드		+	>10
14	4-{{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드		+	>10

[0029]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
15	5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1H-페롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필페라진-2-카르복스아미드		+	>10
16	{1-(시스-4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴		+	>10
17	{1-(시스-4-{[4-[(에틸아미노)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴		+	>10
18	{1-(시스-4-{[4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴		+	>10

[0030]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
19	{1-(시/스-4-{{[4-{{(3R)-3-하이드록시파롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴		+	>10
20	{1-(시/스-4-{{[4-{{(3S)-3-하이드록시파롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴		+	>10
21	{트랜스-3-(4-{{[4-{{(1S)-2-하이드록시-1-메틸에틸}아미노}메틸}-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10

[0031]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
22	{트랜스-3-(4-{{[4-((2R)-2-하이드록시프로필)아미노}메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10
23	{트랜스-3-(4-{{[4-((2S)-2-하이드록시프로필)아미노}메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10

[0032]

제조된 실시 예 번호	화합물명	구조	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
24	{트랜스-3-(4-{{[4-(2-하이드록시에틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴		+	>10

+는 <10 nM 을 의미함 (분석 조건에 관해서는 실시 예 A를 참조함)

^ 거울상 이성질체 1의 데이터

^ 거울상 이성질체 2의 데이터

[0033]

[0034] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]페페리딘-4-일}-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 아디프산염이다.

- [0035] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 (R)-3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴, (R)-3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]파리딘-2-일파롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴, (R)-4-[(4-{3-시아노-2-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴, (R)-4-[(4-{3-시아노-2-[3-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파롤-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 또는 (R)-4-[(4-{3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페녹시}파페리딘-1-일)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]부탄니트릴; 또는 상술한 것들 중 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염중에서 선택된다.
- [0036] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 (S)-3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴, (S)-3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]파리딘-2-일파롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴, (S)-4-[(4-{3-시아노-2-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴, (S)-4-[(4-{3-시아노-2-[3-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파롤-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 또는 (S)-4-[(4-{3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페녹시}파페리딘-1-일)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]부탄니트릴; 또는 상술한 것들 중 어느 하나의 약제학적으로 허용가능한 염중에서 선택된다.
- [0037] 일부 실시 형태에서, JAK1 선택적 억제제는 GLPG0634 (갈라파고스 (Galapagos))이다.
- [0038] 일부 실시 형태에서, 표 2의 화합물은 각각, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, 2010년 5월 21일자로 출원된 미국 특허 공개 제2010/0298334호, 2010년 8월 31일자로 출원된 미국 특허 공개 제2011/0059951호, 2011년 3월 9일자로 출원된 미국 특허 공개 제2011/0224190호, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 특허 공개 제2012/0149681호, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 특허 공개 제2012/0149682호, 2012년 6월 19일자로 출원된 미국 특허 공개 제2013/0018034호, 2012년 8월 17일자로 출원된 미국 특허 공개 제2013/0045963호 및 2013년 5월 17일자로 출원된 미국 특허 공개 제2014/0005166호에 기재된 합성 방법에 의해 제조된다.
- [0039] 일부 실시 형태에서, JAK1 억제제는 각각, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, 2010년 5월 21일자로 출원된 미국 특허 공개 제2010/0298334호, 2010년 8월 31일자로 출원된 미국 특허 공개 제2011/0059951호, 2011년 3월 9일자로 출원된 미국 특허 공개 제2011/0224190호, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 특허 공개 제2012/0149681호, 2011년 11월 18일자로 출원된 미국 특허 공개 제2012/0149682호, 2012년 6월 19일자로 출원된 미국 특허 공개 제2013/0018034호, 2012년 8월 17일자로 출원된 미국 특허 공개 제2013/0045963호 및 2013년 5월 17일자로 출원된 미국 특허 공개 제2014/0005166호의 화합물 중에서 선택된다.
- [0040] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 단일계열 형성이상 불응성 혈구감소증 (RCUD)이다.
- [0041] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 환상 철적모구 불응성 빈혈 (RARS)이다.
- [0042] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 다계열 형성이상 불응성 혈구감소증이다.
- [0043] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 과다 모세포 불응성 빈혈-1 (RAEB-1)이다.
- [0044] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 과다 모세포 불응성 빈혈-2 (RAEB-2)이다.
- [0045] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 미분류 골수형성이상증후군 (MDS-U)이다.
- [0046] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 5q 단독결손 골수형성이상증후군이다.
- [0047] 일부 실시 형태에서, 골수형성이상증후군은 적혈구 생성 촉진제 (ESA)에 불응성이다. 일부 실시 형태에서, ESA에 불응성이란, 40,000 IU/주 이상의 에리트로포이에틴 (EPO) (또는 등가물)의 8주 후에 Hgb가 1.5 g/dL 이상으로 상승되지 않음을 의미한다.
- [0048] 일부 실시 형태에서, 환자는 적혈구 (RBC) 수혈 의존성을 보인다. 일부 실시 형태에서, 적혈구 수혈 의존성은 환자가 치료 전 8주간에 걸쳐서 < 9 g/dL의 Hgb에 대하여 4단위 (unit) 이상의 농축 RBC를 필요로 하는 것을 의미한다.
- [0049] 일부 실시 형태에서, 환자는 건강인 대조군과 비교하여, 혈청 헵시딘 레벨 상승을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 환자는 건강인 대조군과 비교하여, 혈청 c 반응성 단백질 (CRP) 농도 상승을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, CRP의 혈청 농도 상승은 약 10 μ g/mL 이상이 되는 것이다. 일부 실시 형태에서, 건강인은 그 전문이 본원

에 참고로 포함되는 문헌 [Santini, et al., *PLoS One*, 6(8), e23109, pages 1-8 (2011)]에서 정의한 바와 같다.

- [0050] 일부 실시 형태에서, 환자는 개정된 클래스고 예후 스코어 (modified Glasgow Prognostic Score)가 1 또는 2이다. 개정된 클래스고 예후 스코어 (GPS)는 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌 [McMillian, *Cancer Treatment Reviews*, 39 (5):534-540 (2013)]에 기술되어 있다 (특히, 스코어는 표 1에 나타낸 바와 같음).
- [0051] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 어느 하나의 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용되는, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본원에 기재된 어느 하나의 질환 또는 장애의 치료 방법에 사용되는 약제의 제조를 위한 본원의 어느 하나의 실시 형태에 기재된, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [0052] JAK1 선택적 억제제는 또한 본원에 기재된 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 본원에 사용되는 "약제학적으로 허용가능한 염"은 존재하는 산 또는 염기 부분을 이의 염 형태로 전환시켜, 모 화합물 (parent compound)을 변형시키는 개시된 화합물의 유도체를 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 염은 염기성 잔기, 예컨대 아민의 무기산염 또는 유기산염; 산성 잔기, 예컨대 카르복실산의 알칼리염 또는 유기염 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 약제학적으로 허용가능한 염은 예를 들어, 비독성 무기산 또는 유기산으로부터 생성된 모 화합물의 비독성 염을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 염은 염기성 또는 산성 부분을 포함하는 모 화합물로부터, 통상적인 화학적 방법에 의해 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이러한 화합물의 유리산 또는 유리 염기 형태를 물 또는 유기 용매 중에서, 또는 물과 유기 용매의 혼합물 중에서 화학양론적 양의 적절한 염기 또는 산을 반응시켜 제조될 수 있으며; 통상, 에테르, 아세트산에틸, 알코올 (예를 들어, 메탄올, 에탄올, 아이소프로판올 또는 부탄올) 또는 아세토니트릴 (ACN)과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적절한 염의 리스트는 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418] 및 문헌 [Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977)]으로부터 입수된다. 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 화합물은 N-옥사이드 형태를 포함한다.
- [0053] 본원에 기재된 화합물은 비대칭성 (예를 들어, 하나 이상의 입체중심을 가짐)을 나타낼 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 입체 이성질체, 예컨대 거울상 이성질체 및 부분 입체 이성질체를 대상으로 한다. 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 포함하는 본원에 기재된 화합물은 광학 활성체 또는 라세미체로 분리될 수 있다. 라세미 혼합물의 분할 또는 입체 선택적 합성에 의해서와 같은, 광학 불활성 출발 물질로부터 광학 활성체를 제조하는 방법이 당업계에 공지되어 있다. 올레핀, C=N 이중 결합 등의 다양한 기하 이성질체도 본원에 기재된 화합물에 존재할 수 있으며, 모든 이러한 안정한 이성질체가 본 발명에 고려된다. 본 발명의 화합물의 시스 및 트랜스 기하 이성질체가 기재되어 있으며, 이성질체의 혼합물 또는 분리 이성질체로서 분리될 수 있다.
- [0054] 화합물의 라세미 혼합물의 분할은 당업계에 공지된 다수의 방법 중 임의의 방법에 의해 행해질 수 있다. 방법의 일례로는 광학 활성 염 생성 유기산인 키랄 분할 산을 사용하는 분별 재결정을 들 수 있다. 분별 재결정법에 적합한 분할제는 예를 들어, 광학 활성산, 예컨대 D형 및 L형의 타르타르산, 다이아세틸타르타르산, 다이벤조일타르타르산, 만델산, 밀산, 락트산 또는 다양한 광학 활성 카포설폰산, 예컨대 β -카포설폰산이다. 분별 결정법에 적합한 다른 분할제로는 입체 이성질적으로 순수한 형태의 α -메틸벤질아민 (예를 들어, S형 및 R형, 또는 부분 입체 이성질적으로 순수한 형태), 2-페닐글리시놀, 노르에페드린, 에페드린, N-메틸에페드린, 사이클로헥실에틸아민, 1,2-다이아미노사이클로헥산 등을 들 수 있다.
- [0055] 라세미 혼합물의 분할은 또한 광학 활성 분할제 (예를 들어, 다이니트로벤조일페닐글리신)로 충전된 컬럼 상에서 용리에 의해 행해질 수 있다. 적절한 용출 용매 조성은 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0056] 본원에 기재된 화합물에는 호변 이성질체도 포함된다. 호변 이성질체는 동시 양성자 이동과 함께 단일 결합과 인접한 이중 결합의 교환에 의해 형성된다. 호변 이성질체는 동일한 실험식 및 총전하를 갖는 이성질체 양성자 첨가 상태인 양성자성 (prototropic) 호변 이성질체를 포함한다. 양성자성 호변 이성질체의 예로는 케톤 - 엔올 쌍, 아미드 - 아미드산 쌍, 락탐 - 락탐 쌍, 에나민 - 이민 쌍, 및 양성자가 복소환계, 예를 들어, 1H- 및 3H-이미다졸, 1H-, 2H- 및 4H-1,2,4-트라이아졸, 1H- 및 2H-아이소인돌, 및 1H- 및 2H-피라졸의 2개 이상의 위치를 차지할 수 있는 환상 형태를 들 수 있다. 호변 이성질체는 평형 상태로 있거나, 적절한 치환에 의해 하나의 형태로 입체적으로 고정될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 화합물은 또한 중간체 또는 최종 화합물에 발생하는 원자의 모든 동위원소를 포함할 수 있다. 동위원소는 원자번호는 같으나 질량수가 다른 원자를 포함한다. 예를 들어, 수소의 동위원소에는 듀테륨이 포함된

다.

[0058] 본원에 사용되는 용어 "화합물"은 모든 입체 이성질체, 기하 이성질체, 호변 이성질체, 및 나타낸 구조의 동위 원소를 포함하는 것으로 의도된다. 게다가, 하나의 특정한 호변 이성질체로서 명칭 또는 구조로 특정된 본원의 화합물은 달리 명시되지 않는 한, 다른 호변 이성질체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0059] 모든 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 다른 물질, 예컨대 물 및 용매와 함께 발견될 수 있거나 (예를 들어, 수화물 및 용매화물), 분리될 수 있다.

[0060] 일부 실시 형태에서, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 염은 실질적으로 분리된다. "실질적으로 분리되다"란, 화합물이 생성되거나 검출되는 환경으로부터 상기 화합물이 적어도 부분적으로 또는 실질적으로 분리된다는 것을 의미한다. 부분적인 분리는 예를 들어, 본 발명의 화합물이 풍부한 조성물을 포함할 수 있다. 실질적인 분리는 적어도 약 50 중량%, 적어도 약 60 중량%, 적어도 약 70 중량%, 적어도 약 80 중량%, 적어도 약 90 중량, 적어도 약 95 중량%, 적어도 약 97 중량% 또는 적어도 약 99%의 본 발명의 화합물 또는 이의 염을 함유하는 조성물을 포함할 수 있다. 화합물 및 이의 염의 분리 방법은 당업계에서 통상적이다.

[0061] 상호 교환적으로 사용된, 본원에 사용되는 용어 "개체" 또는 "환자"는 포유동물, 바람직하게는 마우스, 래트, 다른 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말 또는 영장류, 가장 바람직하게는 인간을 비롯한 동물을 지칭한다.

[0062] 본원에 사용되는 어구 "치료적 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의가 구하고자 하는, 조직, 시스템, 동물, 개체 또는 인간에 있어서의 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 화합물 또는 약제학적 제제의 양을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 치료적 유효량은 약 1 mg 내지 약 100 mg, 약 1 mg 내지 약 20 mg, 약 4 mg 내지 약 10 mg, 약 5 mg 내지 약 1000 mg, 또는 약 10 mg 내지 약 500 mg이다. 일부 실시 형태에서, 치료적 유효량은 4 mg, 6 mg 또는 10 mg QD이다.

[0063] 어구 "약제학적으로 허용가능한"은 적절한 의학적 판단의 범위 내에서 적정한 유익성/위험성 비 (benefit/risk ratio)에 상응하게 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 그 밖의 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉한 상태로 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0064] 본원에 사용되는 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 (1) 질환을 예방하는 것; 예를 들어, 질환, 상태 또는 장애에 걸리기 쉬울 수 있으나 아직 질환의 병상 또는 증상을 경험하거나 나타내지 않는 개체의 질환, 상태 또는 장애를 예방하는 것; (2) 질환을 억제하는 것; 예를 들어, 질환, 상태 또는 장애의 병상 또는 증상을 경험하거나 나타내고 있는 개체의 질환, 상태 또는 장애를 억제하는 것 (즉, 병상 및/또는 증상의 더 이상의 진행을 정지시키는 것); 및 (3) 질환을 개선시키는 것; 예를 들어, 질환, 상태 또는 장애의 병상 또는 증상을 경험하거나 나타내고 있는 개체의 질환, 상태 또는 장애를 개선시키는 것 (즉, 병상 및/또는 증상을 회복시키는 것), 예컨대 질환의 중증도를 감소시키는 것 중 하나 이상을 지칭한다.

병용 요법

[0066] 본원에 기재된 방법은 하나 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 치료제가 동시에 또는 연속적으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0067] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 IMiD, 항IL-6 제제, 항TNF- α 제제, 저메틸화제 및 생물학적 반응 조절제 (BRM) 중에서 선택되는 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0068] 일반적으로, BRM은 질환을 치료하도록 생체로부터 만들어진 물질이며, 체내에 자연적으로 발생할 수 있거나 실험실에서 제조될 수 있다. BRM의 예로는 IL-2, 인터페론, 다양한 종류의 콜로니 자극 인자 (CSF, GM-CSF, G-CSF), 모노클로널 항체, 예컨대 암식시맙, 에타네르셉트, 인플릭시맙, 리툭시맙, 트라스투즈맙, 및 고용량 아스코르베이트를 들 수 있다.

[0069] 일부 실시 형태에서, 항TNF- α 제제는 인플릭시맙 및 에타네르셉트이다.

[0070] 일부 실시 형태에서, 저메틸화제는 DNA 메틸트랜스퍼라아제 억제제이다. 일부 실시 형태에서, DNA 메틸트랜스퍼라아제 억제제는 5-아자시티딘 및 데시타빈 중에서 선택된다.

[0071] 일반적으로, IMiD는 면역조절제로서 존재한다. 일부 실시 형태에서, IMiD는 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, CC-11006 및 CC-10015 중에서 선택된다.

- [0072] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 항흉선세포글로불린, 재조합 인간 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 과립구-단핵구 CSF (GM-CSF), 적혈구 생성 촉진제 (ESA) 및 사이클로스포린 중에서 선택되는 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0073] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 추가의 JAK 억제제를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 추가의 JAK 억제제는 토파시티닙 또는 륙솔리티닙이다.
- [0074] 하나 이상의 추가의 치료제로는 화학요법제, 항염증제, 스테로이드, 면역억제제, 및 예를 들어, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 WO 2006/056399에 기재된 것들과 같은 Bcr-Ab1, Flt-3, RAF 및 FAK 키나제 억제제를 포함할 수 있거나, 다른 제제가 본원에 기재된 화합물과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0075] 화학요법제의 예로는 프로테아솜 억제제 (예를 들어, 보르테조닙), 탈리도마이드, 레블리미드, 및 DNA 손상제, 예컨대 멜팔란, 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 빙크리스틴, 에토포시드, 카무스틴 등을 들 수 있다.
- [0076] 스테로이드의 예로는 코르티코스테로이드, 예컨대 텍사메타손 또는 프레드니손을 들 수 있다.
- [0077] Bcr-Ab1 억제제의 예로는 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, 미국 특허 제5,521,184호, WO 04/005281 및 미국 특허 출원 제60/578,491호에 개시된 속과 종의 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 들 수 있다.
- [0078] 적절한 Flt-3 억제제의 예로는 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, WO 03/037347, WO 03/099771 및 WO 04/046120에 개시된 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 들 수 있다.
- [0079] 적절한 RAF 억제제의 예로는 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, WO 00/09495 및 WO 05/028444에 개시된 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 들 수 있다.
- [0080] 적절한 FAK 억제제의 예로는 모두 그 전문이 본원에 참고로 포함되는, WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 및 WO 01/014402에 개시된 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 들 수 있다.
- [0081] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 본 발명의 화합물은 특히 이마티닙 또는 다른 키나제 억제제에 대하여 내성을 갖는 환자를 치료하기 위해, 이마티닙을 비롯한 하나 이상의 다른 키나제 억제제와 병용하여 사용될 수 있다.
- [0082] 일부 실시 형태에서, 적절한 화학요법제가 대사길항제, 제1형 토포아이소머라제 억제제, 백금 유사체, 탁산, 안트라사이클린 및 EGFR 억제제, 및 이들의 조합 중에서 선택될 수 있다.
- [0083] 일부 실시 형태에서, 대사길항제로는 카페시타빈, 켐시타빈 및 플루오로우라실 (5-FU)을 들 수 있다.
- [0084] 일부 실시 형태에서, 탁산으로는 파클리탁셀, 아브락산 (Abraxane)® (주사형 혼탁액 (injectable suspension)의 파클리탁셀 단백질 결합 입자) 및 탁소텔 (Taxotere)® (도세탁셀)을 들 수 있다.
- [0085] 일부 실시 형태에서, 백금 유사체로는 옥살리플라틴, 시스플라틴 및 카보플라틴을 들 수 있다.
- [0086] 일부 실시 형태에서, 제1형 토포아이소머라제 억제제로는 이리노테칸 및 토포테칸을 들 수 있다.
- [0087] 일부 실시 형태에서, 안트라사이클린으로는 독소루비신 또는 독소루비신 리포좀 제제를 들 수 있다.
- [0088] 일부 실시 형태에서, 화학요법제는 폴피리녹스 (FOLFIRINOX; 5-FU, 류코보린, 이리노테칸 및 옥살리플라틴)이다. 일부 실시 형태에서, 화학요법제는 켐시타빈 및 아브락산® (주사형 혼탁액의 파클리탁셀 단백질 결합 입자)이다.
- [0089] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 멜팔란, 멜팔란 + 프레드니손 [MP], 독소루비신, 텍사메타손 및 벨케이드 (Velcade; 보르테조닙)이다. 또한, 다발성 골수종의 치료에 사용되는 추가의 제제로는 Bcr-Ab1, Flt-3, RAF 및 FAK 키나제 억제제를 들 수 있다. 상기 제제는 단회 또는 지속형 투여 형태로는 본 발명의 화합물과 병용될 수 있거나, 상기 제제는 개별 투여 형태로서 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다.
- [0090] 일부 실시 형태에서, 코르티코스테로이드, 예컨대 텍사메타손은 적어도 하나의 JAK1선택적 억제제와 병용하여 환자에게 투여되는데, 여기서 텍사메타손은 연속적이 아니라 간헐적으로 투여된다.
- [0091] 일부의 추가의 실시 형태에서, 하나 이상의 JAK1 선택적 억제제와 다른 치료제의 배합제가 골수 이식 또는 조혈 모세포 이식 전에, 이식 시에 및/또는 이식 후에 환자에게 투여될 수 있다.
- [0092] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 플루오시놀론 아세토니드 (레티서트 (Retisert)®) 또는 리맥솔론 (AL-

2178, 베솔 (Vexol), 알콘 (Alcon))이다.

[0093] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 사이클로스포린 (레스타시스 (Restasis)®)이다.

[0094] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 코르티코스테로이드이다. 일부 실시 형태에서, 코르티코스테로이드는 트리암시놀론, 텍사메타손, 플루오시놀론, 코르티손, 프레드니솔론 또는 플루메토론이다.

[0095] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 데하이드렉스(Dehydrex)™ (홀레스 랩스 (Holles Labs)), 사이바마이드 (Civamide; 옵코 (Opko)), 허알루론산나트륨 (비스메드 (Vismed), 란티비오/티알비 케메디카 (Lantibio/TRB Chemedica)), 사이클로스포린 (ST-603, 시리온 테라퓨틱스 (Sirion Therapeutics)), ARG101(T) (테스토스테론, 아르젠티스 (Argentis)), AGR1012(P) (아르젠티스), 에카베트나트륨 (센쥬-아이스타 (Senju-Ista)), 게파르네이트 (산텐 (Santen)), 15-(s)-하이드록시에이코사테트라엔산 (15(S)-HETE), 세빌레민, 독시사이클린 (ALTY-0501, 알라크리티 (Alacrity)), 미노사이클린, 아이데스트린 (iDestrin)™ (NP50301, 나센트 파마슈티칼즈 (Nascent Pharmaceuticals)), 사이클로스포린 A (Nova22007, 노바칼리 (Novagali)), 옥시테트라사이클린 (듀라마이신 (Duramycin), MOLI1901, 란티비오), CF101 (2S,3S,4R,5R)-3,4-다이하이드록시-5-[6-[(3-요오도페닐)메틸아미노]푸린-9-일]-N-메틸-옥솔란-2-카르바밀, 캔-파이트 바이오파마 (Can-Fite BioPharma), 보클로스포린 (LX212 또는 LX214, 럭스 바이오사이언스 (Lux Biosciences)), ARG103 (아르젠티스), RX-10045 (합성 레솔빈 유사체, 레솔빅스 (Resolvyx)), DYN15 (다이안미스 테라퓨틱스 (Dyanmis Therapeutics)), 리보글리타존 (DE011, 다이이치 산쿄 (Daiichi Sanko)), TB4 리젤클라스 (RegeneRx)), OPH-01 (옵탈미스 모나코 (Ophthalmic Monaco)), PCS101 (페리코르 사이언스 (Pericor Science)), REV1-31 (에볼루텍 (Evolutec)), 라크리틴 (Lacritin; 센쥬 (Senju)), 레바미피드 (오츠카-노바티스 (Otsuka-Novartis)), OT-551 (오테라 (Othera)), PAI-2 (유니버시티 오브 펜실베이니아 앤드 템플 유니버시티 (University of Pennsylvania and Temple University)), 필로카르핀, 타크롤리무스, 피메크롤리무스 (AMS981, 노바티스), 로테프레드놀 에타보네이트, 리톡시맙, 다이쿠아포솔 테트라소듐 (INS365, 인스파이어 (Inspire)), KLS-0611 (키세이 파마슈티칼즈 (Kissei Pharmaceuticals)), 데하이드로에피안드로스테론, 아나킨라, 에팔리주맙, 미코페놀레이트 나트륨, 에타네르셉트 (엠브렐 (Embrel)®), 하이드록시로로퀸, NGX267 (토레이파인스 테라퓨틱스 (TorreyPines Therapeutics)), 악템라, 켐시타빈, 옥살리플라틴, L-아스파라기나아제 또는 탈리도마이드 중에서 선택된다.

[0096] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 예를 들어, 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 WO 2006/056399에 기재된 것과 같은, 혈관신생 억제제, 콜린 작용제, TRP-1 수용체 조절제, 칼슘 채널 차단제, 뮤신 분비촉진제, MUC1 자극제, 칼시뉴린 억제제, 코르티코스테로이드, P2Y2 수용체 작용제, 무스카린 수용체 작용제, mTOR 억제제, 다른 JAK 억제제, Bcr-Abl 키나제 억제제, F1t-3 키나제 억제제, RAF 키나제 억제제 및 FAK 키나제 억제제이다. 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 테트라사이클린 유도체 (예를 들어, 미노사이클린 또는 독시사이클린)이다. 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 FKBP12와 결합한다.

[0097] 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 알킬화제 또는 DNA 가교결합제; 대사길항제/탈메틸화제 (예를 들어, 5-플루오로우라실, 카페시타빈 또는 아자시티딘); 항호르몬 치료제 (anti-hormone therapy; 예를 들어, 호르몬 수용체 길항제, SERM 또는 아로마타제 억제제); 유사분열억제제 (예를 들어, 빙크리스틴 또는 파클리탁센); 토포아이소머라제 (I 또는 II) 억제제 (예를 들어, 미톡산트론 및 이리노테칸); 아포프토시스 유도제 (예를 들어, ABT-737); 핵산 치료제 (nucleic acid therapy; 예를 들어, 안티센스 또는 RNAi); 핵 수용체 리간드 (예를 들어, 작용제 및/또는 길항제: 올트랜스 레티노산 또는 벡사로텐); 에피제네틱 표적치료제 (epigenetic targeting agent), 예컨대 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제 (예를 들어, 보리노스타트), 저메틸화제 (예를 들어, 데시타빈); 단백질 안정성 조절제, 예컨대 Hsp90 억제제, 유비퀴틴 및/또는 유비퀴틴 유사 결합 (conjugating) 또는 비결합 (deconjugating) 분자; 또는 EGFR 억제제 (예를로티닙)이다.

[0098] 약제학적 제형 및 투여 형태

[0099] 약제로서 사용되는 경우에, JAK1 선택적 억제제는 약제학적 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 제약 분야에 주지된 방법으로 제조될 수 있으며, 국소 치료가 요구되든 전신 치료가 요구되는지에 따라서 치료 부위에 따라 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 국소 (경피, 표피, 안구, 및 비강내, 질내 및 직장 전달을 비롯한 점막으로), 경폐 (예를 들어, 네뷸라이저에 의한 것을 비롯한 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기기에 의해; 기관내 또는 비강내), 경구 또는 비경구 투여일 수 있다. 비경구 투여로는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내, 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내, 예를 들어, 척수강내 또는 뇌실내 투여를 들 수 있다. 비경구 투여는 단회 볼루스 투여 형태일 수 있거나, 예를 들어, 연속주입펌프 (continuous perfusion pump)로 될 수 있다. 국소 투여용 약제학적 조성물 및 약제학적 제형으로는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적약 (drop), 쥐약,

스프레이, 액체 및 분말을 들 수 있다. 통상적인 약제학적 담체, 수성, 분말 또는 유성 베이스, 중점제 등이 필요할 수 있거나 바람직할 수 있다.

[0100] 본 발명은 또한 활성 성분으로서, 본원에 기재된 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 (부형제)와 함께 함유하는 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 국소 투여에 적합하다. 상기 조성물을 제조하는데 있어서, 활성 성분은 전형적으로 부형제와 혼합하거나, 부형제로 희석하거나, 이러한 담체 내에 예를 들어, 캡슐, 샤ퟜ (sachet), 페이퍼 또는 다른 용기 형태로 봉입된다. 부형제가 희석제로서 작용하는 경우에, 고체, 반고체 또는 액체 물질일 수 있으며, 이는 활성 성분을 위한 비히클, 담체 또는 매질로서 작용한다. 따라서, 상기 조성물은 정제, 환약, 분말제, 로젠지, 샤ퟜ, 카세 (cachet), 엘릭시르, 혼탁제, 에멀젼, 액제, 시럽, 에어로졸 (고체로서 또는 액체 매질 중), 연고 (예를 들어, 활성 화합물 10 중량% 이하를 함유함), 연질 및 경질 젤라틴 캡슐, 좌약, 멸균 주사제 및 멸균 포장된 분말제 (sterile packaged powder)의 형태일 수 있다.

[0101] 제형을 제조함에 있어서, 활성 화합물은 다른 성분을 배합하기 전에 적절한 입자 크기를 제공하도록 밀링될 수 있다. 활성 화합물이 실질적으로 불용성인 경우에, 200 메쉬 미만의 입자 크기로 밀링될 수 있다. 활성 화합물이 실질적으로 수용성인 경우에, 입자 크기는 제형 중에 실질적으로 균일한 분포를 제공하도록 밀링함으로써, 예를 들어, 약 40 메쉬로 조절될 수 있다.

[0102] JAK1 선택적 억제제는 정제 제형 및 다른 제형 타입에 적합한 입자 크기를 얻기 위해 공지된 밀링 방법, 예컨대 습식 밀링을 사용하여 밀링될 수 있다. JAK1 선택적 억제제의 미분 (나노입자) 제제는 당업계에 공지된 프로세스 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 2002/000196호 참조)에 의해 제조될 수 있다.

[0103] 적절한 부형제의 몇가지 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 검, 인산칼슘, 알긴산염, 트래거캔스 고무, 젤라틴, 규산칼슘, 미결정 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽 및 메틸 셀룰로오스를 들 수 있다. 제형은 추가로 윤활제, 예컨대 텔크, 스테아르산마그네슘 및 광유; 습윤제; 유화제 및 혼탁화제; 보존제, 예컨대 메틸- 및 프로필하이드록시-벤조에이트; 감미제; 및 향미제를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 당업계에 공지된 절차를 이용하여, 환자에게 투여 후에 활성 성분의 급속 방출, 지속 방출 또는 지연 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다.

[0104] 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 규화 미결정 셀룰로오스 (SMCC)와, 본원에 기재된 적어도 하나의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 규화 미결정 셀룰로오스는 미결정 셀룰로오스 약 98% w/w 및 이산화규소 약 2% w/w를 포함한다.

[0105] 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 적어도 하나의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 지속 방출성 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 적어도 하나의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 미결정 셀룰로오스, 락토스 일수화물, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 및 폴리에틸렌 옥사이드 중에서 선택되는 적어도 하나의 성분을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 적어도 하나의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 미결정 셀룰로오스, 락토스 일수화물 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 본원에 기재된 적어도 하나의 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 미결정 셀룰로오스, 락토스 일수화물 및 폴리에틸렌 옥사이드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 추가로 스테아르산마그네슘 또는 이산화규소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 미결정 셀룰로오스는 아비셀 (Avicel) PH102TM이다. 일부 실시 형태에서, 락토스 일수화물은 패스트-플로 (Fast-flo) 316TM이다. 일부 실시 형태에서, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 2208 K4M (예를 들어, 메토셀 (Methocel) K4 M 프레미어 (Premier)TM) 및/또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 2208 K100LV (예를 들어, 메토셀 K100LVTM)이다. 일부 실시 형태에서, 폴리에틸렌 옥사이드는 폴리에틸렌 옥사이드 WSR 1105 (예를 들어, 폴리옥스 (Polyox) WSR 1105TM)이다.

[0106] 일부 실시 형태에서, 습식 조립 과정이 상기 조성물을 제조하는데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 건식 조립 과정이 상기 조성물을 제조하는데 사용된다.

[0107] 상기 조성물은 단위 투여 형태로 제형화될 수 있으며, 각 용량은 활성 성분 약 5 내지 약 1,000 mg (1 g), 더욱 통상적으로는 약 100 mg 내지 약 500 mg를 함유한다. 일부 실시 형태에서, 각 용량은 활성 성분 약 10 mg을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 각 용량은 활성 성분 약 50 mg을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 각 용량은 활성 성분 약 25 mg을 함유한다. 용어 "단위 투여 형태"는 인간 피험자 및 다른 포유동물에 대한 단위 용량으로

서 적합한 물리적 개별 단위 (physically discrete unit)를 지칭하며, 각 단위는 적절한 약제학적 부형제와 협력하여, 원하는 치료 효과를 가져오도록 계산된 소정량의 활성 물질을 함유한다.

- [0108] 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 활성 성분 약 2 mg 내지 약 10 mg, 또는 약 5 mg 내지 약 50 mg을 함유한다. 당업자는 이로써, 활성 성분 약 2 mg 내지 약 10 mg, 5 mg 내지 약 10 mg, 약 10 mg 내지 약 15 mg, 약 15 mg 내지 약 20 mg, 약 20 mg 내지 약 25 mg, 약 25 mg 내지 약 30 mg, 약 30 mg 내지 약 35 mg, 약 35 mg 내지 약 40 mg, 약 40 mg 내지 약 45 mg, 또는 약 45 mg 내지 약 50 mg을 함유하는 화합물 또는 조성물을 구현한다는 것을 인식할 것이다.
- [0109] 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 활성 성분 약 50 mg 내지 약 500 mg을 함유한다. 당업자는 이로써, 활성 성분 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 100 mg 내지 약 150 mg, 약 150 mg 내지 약 200 mg, 약 200 mg 내지 약 250 mg, 약 250 mg 내지 약 300 mg, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 450 mg 내지 약 500 mg을 함유하는 화합물 또는 조성물을 구현한다는 것을 인식할 것이다.
- [0110] 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 활성 성분 약 500 mg 내지 약 1,000 mg을 함유한다. 당업자는 이로써, 활성 성분 약 500 mg 내지 약 550 mg, 약 550 mg 내지 약 600 mg, 약 600 mg 내지 약 650 mg, 약 650 mg 내지 약 700 mg, 약 700 mg 내지 약 750 mg, 약 750 mg 내지 약 800 mg, 약 800 mg 내지 약 850 mg, 약 850 mg 내지 약 900 mg, 약 900 mg 내지 약 950 mg, 또는 약 950 mg 내지 약 1000 mg을 함유하는 화합물 또는 조성물을 구현한다는 것을 인식할 것이다.
- [0111] 활성 화합물은 넓은 용량 범위에 걸쳐서 효과적일 수 있으며, 일반적으로 약제학적 유효량으로 투여된다. 그러나, 실제로 투여된 화합물의 양이 통상, 치료할 상태, 선택된 투여 경로, 투여된 실제 화합물, 개개의 환자의 연령, 체중 및 반응, 환자 증상의 중증도 등을 비롯한 관련 상황에 따라, 의사에 의해 결정될 것임을 이해할 것이다.
- [0112] 고체 조성물, 예컨대 정제를 제조하기 위해, 주요 활성 성분은 약제학적 부형제와 혼합하여, 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 균일 혼합물을 함유하는 고체 예비제형 (preformulation) 조성물을 생성한다. 이러한 예비제형 조성물을 균일한 것으로 언급하는 경우, 활성 성분은 통상적으로, 상기 조성물이 동일하게 효과적인 단위 투여 형태, 예컨대 정제, 환약 및 캡슐로 용이하게 세분될 수 있도록 상기 조성물에 걸쳐서 균등하게 분포된다. 그 다음에 이러한 고체 예비제형은 예를 들어, 본 발명의 활성 성분 약 0.1 내지 약 1000 mg을 함유하는 상술한 타입의 단위 투여 형태로 세분된다.
- [0113] 정제 또는 환약은 코팅되거나, 아니면 배합되어 지속성 작용의 이점을 부여하는 투여 형태가 얻어진다. 예를 들어, 정제 또는 환약은 내부 용량 성분 및 외부 용량 성분을 포함하고 있으며, 외부 용량 성분은 내부 용량 성분에 대한 외피 (envelope)의 형태로 되어 있다. 두 가지 성분은 위에서의 분해에 저항하여, 내부 성분이 십이 지장으로 그대로 들어가게 하거나 방출이 지연되게 할 수 있는 장용층에 의해 분리될 수 있다. 다양한 물질이 이러한 장용층 또는 코팅에 사용될 수 있고, 이러한 물질은 다수의 폴리머산, 및 폴리머산과 셀락, 세틸 알코올 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 물질의 혼합물을 포함한다.
- [0114] 화합물 및 조성물이 경구 투여 또는 주사에 의한 투여를 위해 혼입될 수 있는 액체 형태에는 수용액과, 적절히 풍미를 더한 시럽과, 수성 또는 오일 혼탁액과, 식용유, 예컨대 면실유, 참기름, 코코넛유 또는 낙화생유, 및 엘릭시르 및 유사한 약제학적 비히클과의 풍미를 더한 애벌전이 포함된다.
- [0115] 흡입 또는 통기용 조성물에는 약제학적으로 허용가능한 수성 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 중의 용액 및 혼탁액, 및 분말이 포함된다. 액체 또는 고체 조성물은 상술한 적절한 약제학적으로 허용가능한 부형제를 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 조성물은 국소 또는 전신적 효과를 위해 경구 또는 비강 호흡 경로에 의해 투여된다. 조성물은 불활성 기체를 사용하여 분무(nebulizing)될 수 있다. 분무된 용액은 분무 장치로부터 직접 흡입될 수 있거나, 분무 장치는 페이스 마스크 텐트 또는 간헐적 양압 호흡기에 부착될 수 있다. 용액, 혼탁액 또는 분말 조성물은 적절한 방법으로 제형을 전달하는 장치로부터 경구 또는 비강 투여될 수 있다.
- [0116] 국소 제형은 하나 이상의 통상적인 담체를 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 연고는 물과, 예를 들어, 유동 파라핀, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 프로필렌 글리콜, 화이트 바셀린 등 중에서 선택되는 하나 이상의 소수성 담체를 함유할 수 있다. 크림 담체 조성물은 글리세롤 및 하나 이상의 다른 성분, 예를 들어 글리세린모노스테아레이트, PEG-글리세린모노스테아레이트 및 세틸스테아릴 알코올과 배합한 물을 기제로 할 수 있다. 젤은 예를 들어, 글리세롤, 하이드록시에틸 셀룰로오스 등과 같은 기타 성분과 적절히 배합한 아이소프로필 알코

울 및 물을 사용하여 제형화될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 국소 제형은 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약 제학적으로 허용가능한 염 약 0.1 wt% 이상, 약 0.25 wt% 이상, 약 0.5 wt% 이상, 약 1 wt% 이상, 약 2 wt% 이상 또는 약 5 wt% 이상을 함유한다. 국소 제형은 임의로 선택 정후, 예를 들어 건선 또는 다른 피부 상태의 치료 설명서와 결합된, 예를 들어 100 g의 튜브에 적절히 포장될 수 있다.

[0117] 환자에게 투여되는 화합물 또는 조성물의 양은 투여하려는 것, 투여 목적, 예컨대 예방 또는 치료, 환자의 상태, 투여 방법 등에 따라 달라질 것이다. 치료 적용에 있어서, 조성물은 이미 질환을 앓고 있는 환자에게 상기 질환 및 이의 합병증의 증상을 치료하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 유효 용량은 치료할 병상뿐만 아니라, 환자의 질환 중증도, 연령, 체중 및 전신 상태 등의 인자에 따른 주치의의 판단에 의해 결정될 것이다.

[0118] 환자에게 투여되는 조성물은 상술한 약제학적 조성물의 형태일 수 있다. 이러한 조성물은 통상적인 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나, 멸균 필터될 수 있다. 수용액은 그대로 사용하기 위해 포장될 수 있거나, 동결 건조될 수 있으며, 동결 건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체와 배합된다. 복합 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 더욱 바람직하게는 5 내지 9, 가장 바람직하게는 7 내지 8일 것이다. 특정한 상술한 부형제, 담체 또는 안정제의 사용에 의해 약제학적 염이 형성될 것임을 이해할 것이다.

[0119] 본원에 기재된 JAK1 선택적 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료 용량은 예를 들어, 치료가 행해지는 특정 용도, 화합물의 투여 방법, 환자의 건강 및 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다. 약제학적 조성물 중의 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 비율 또는 농도는 용량, 화학적 특성 (예를 들어, 소수성) 및 투여 경로를 비롯한 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, JAK1 선택적 억제제는 비경구 투여를 위해 화합물 약 0.1 내지 약 10% w/v를 함유하는 생리적 완충수용액으로 제공될 수 있다. 몇몇 전형적인 용량 범위는 1일 약 1 µg/kg(체중) 내지 약 1 g/kg(체중)이다. 일부 실시 형태에서, 용량 범위는 1일 약 0.01 mg/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중)이다. 용량은 질환 또는 장애의 진행 타입 및 진행 정도, 특정 환자의 전반적인 건강 상태, 선택된 화합물의 상대적 생물학적 효율, 부형제의 제형 및 이의 투여 경로와 같은 변수에 따라 달라질 것이다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 테스트 시스템으로부터 유도된 용량 반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.

[0120] 본 발명의 조성물은 하나 이상의 추가의 약제학적 제제, 예컨대 화학요법제, 스테로이드, 항염증성 화합물 또는 면역억제제를 추가로 포함할 수 있으며, 이들의 예는 상기에 기재되어 있다.

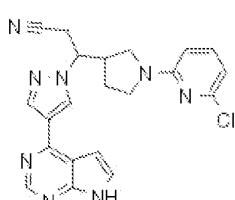
[0121] 키트

[0122] 본 발명은 또한 예를 들어, 골수형성이상증후군의 치료 또는 예방에 유용한 약제학적 키트를 포함하며, 상기 키트는 본원에 기재된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 함유하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 이러한 키트는 당업자에게 자명한 바와 같이, 필요에 따라, 예를 들어 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 용기, 추가의 용기 등과 같은 하나 이상의 다양한 통상적인 약제학적 키트 구성품을 추가로 포함할 수 있다. 투여할 성분의 양을 나타내는 인서트 또는 라벨로서의 설명서, 투여 가이드라인 및/또는 성분을 혼합하기 위한 가이드라인도 키트에 포함될 수 있다.

[0123] 실시예

[0124] 본 발명은 구체적인 실시예에 의해 더욱 상세히 설명될 것이다. 하기 실시예는 예시하기 위해 주어지는 것으로, 본 발명을 어떤 식으로든 제한하고자 하는 것은 아니다. 당업자는 변경되거나 변형되어 실질적으로 동일한 결과를 산출할 수 있는 다양한 비임계 파라미터를 용이하게 인식할 것이다. 실시예의 화합물은 본원에 기재된 적어도 하나의 분석에 따라 JAK 억제제인 것으로 드러났다.

[0125] 실시예 1. 3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴 (분리된 2개의 상이한 거울상 이성질체)



[0126]

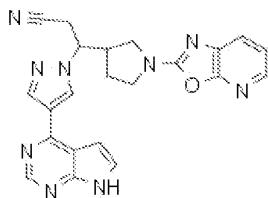
- [0127] 단계 1. 벤질 3-{2-시아노-1-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]에틸}파롤리딘-1-카르복실레이트
- [0128] 벤질 3-[2-시아노비닐]파롤리딘-1-카르복실레이트 (4.3 g, 0.017 mol, WO 2007/070514 Ex.742에 기재된 바와 같이 제조된 E 이성질체와 Z 이성질체의 혼합물)을 아세토니트릴 (270 mL)에 용해시켰다. 1,8-다이아자바이사이클로[5.4.0]운데스-7-엔 (5.02 mL, 0.0336 mol), 이어서 4-(1H-파라졸-4-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘 (5.6 g, 0.017 mol, WO 2007/070514, Ex.65에 기재된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 실온 (RT)에서 하룻밤 동안 교반하였다. 용매를 회전 증발에 의해 제거하여, 잔류물을 아세트산에틸에 다시 용해시켰다. 용액을 연속적으로 1N HCl, 물, 포화 중탄산나트륨 및 염수로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시켜, 진공 중에서 농축시켰다. 생성물을 헥산 중의 0 내지 100% 아세트산에틸의 그래디언트 (gradient)로 용리되는 실리카 겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 부분 입체 이성질체 1 (첫 번째로 용출됨) (3.5 g, 36%) 및 부분 입체 이성질체 2 (두 번째로 용출됨) (2.5 g, 25%)를 얻었다. LCMS (M+H)⁺: 572.2.
- [0129] 단계 2. 3-파롤리딘-3-일-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴
- [0130] 벤질
3-{2-시아노-1-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]에틸}파롤리딘-1-카르복실레이트 (3.5 g, 6.1 mmol) (실시예 1, 단계 1의 부분 입체 이성질체 1)를 100 mL 메탄올에 용해시켜, 촉매량의 10% Pd-C를 첨가하였다. 혼합물을 수소 50 psi 하에 24시간 동안 진탕시켰다. 그 다음에 혼합물을 여과하여, 용매를 진공 중에서 제거하였다. 생성물을 추가의 정제없이 사용하였다. LCMS (M+H)⁺: 438.2.
- [0131] 단계 3. 3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴
- [0132] NMP (1.6 mL) 및 N,N-다이아이소프로필에틸아민 (96 μL, 0.55 mmol) 중의 3-파롤리딘-3-일-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴 (150 mg, 0.27 mmol)과 2,6-다이클로로파리딘 (48.7 mg, 0.329 mmol)의 혼합물을 마이크로웨이브에서 20분간 135°C로 가열하였다. 헥산 중의 0 내지 80% 아세트산에틸의 그래디언트로 용리되는 실리카 겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 생성물 (28 mg, 18%)을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.85 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.37 (dd, 1H), 6.79 (d, 1H), 6.57 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.45 (dt, 1H), 3.91 (dd, 1H), 3.57-3.46 (m, 3H), 3.39-3.29 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H), 3.13-3.01 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.82-1.69 (m, 1H), 0.95-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 549.1.
- [0133] 이러한 라세미 생성물을 키랄 HPLC (키랄 테크놀러지스 키랄셀 (Chiral Technologies Chiralcel) OJ-H, 5 μ, 30 × 250 mm, 45% EtOH/헥산, 20 mL/min)로 이의 거울상 이성질체로 분리하여, 거울상 이성질체 1 (첫 번째로 용출됨, 체류시간 40.7 min) 및 거울상 이성질체 2 (두 번째로 용출됨, 체류시간 51.6 min)를 얻어, 단계 4a/4b에서 별도로 탈보호하였다.
- [0134] 단계 4a. 3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴 (거울상 이성질체 1)
- [0135] 3-[1-(6-클로로파리딘-2-일)파롤리딘-3-일]-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]프로판니트릴 (단계 3의 거울상 이성질체 1)을 1:1 TFA/DCM (2 mL)을 함유하는 용액 중에서 2시간 동안 교반한 다음에, 농축시켰다. 잔류물을 1 mL MeOH에 용해시키고, 0.2 mL EDA를 첨가하였다. 분취용 HPLC/MS (0.15% NH₄OH를 함유하는 ACN/H₂O의 그래디언트로 용리되는 C18 컬럼)에 의해 정제하여, 생성물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.44 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.39 (dd, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.13-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 2.00-1.88 (m, 1H), 1.84-1.71 (m,

1H); LCMS ($M+H$)⁺: 419.1.

[0136] 단계 4b. 3-[1-(6-클로로페리딘-2-일)페롤리딘-3-일]-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴(거울상 이성질체 2)

[0137] 단계 3의 거울상 이성질체 2를 사용하여, 단계 4a에서와 같이 행하였다: 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 9.59 (br s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 7.40 (dd, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.79 (dd, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.22 (d, 1H), 4.46 (dt, 1H), 3.92 (dd, 1H), 3.55-3.48 (m, 1H), 3.39-3.31 (m, 2H), 3.25 (dd, 1H), 3.14-3.02 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 1.99-1.90 (m, 1H), 1.83-1.72 (m, 1H); LCMS ($M+H$)⁺: 419.1.

[0138] 실시예 2. 3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴 (분리된 1개의 거울상 이성질체)



[0139]

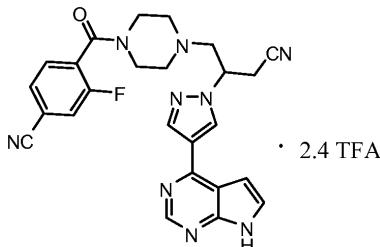
[0140] 단계 1. 3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7-[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴

[0141] 1,4-다이옥산 (30 mL) 중의 옥사졸로[5,4-b]페리딘-2(1H)-티온 (1.17 g, 7.68 mmol, US 2010/0298334의 실시예 33, 단계 4에서와 같이 제조됨) 및 3-페롤리딘-3-일-3-[4-(7-[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴 (2.80 g, 6.40 mmol, 실시예 15, 단계 3)을 2시간 동안 70°C로 가열하였다. 용매를 진공 중에서 제거하였다. 조생성물을 에탄올 (40 mL)로 원상태로 만들어, 20시간에 걸쳐서 조금씩 질산은 (3 g, 15 mmol) 및 수산화암모늄 수용액 (6 mL)으로 처리하였다. 반응물에 물, 1N NaOH 및 염수를 첨가하였다. 불용성 물질을 여과에 의해 제거하였다. 여과액 층을 분리하였다. 수성 부분을 세 부분의 아세트산에틸로 추출하였다. 추출물을 황산나트륨으로 건조시키고, 디캔테이션하여, 농축시켰다. 조생성물을 10% MeOH/DCM으로 용리되는 실리카 젤 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 황백색 폼 (foam) (2.84 g, 80%)으로서의 생성물을 얻었다. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.83 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.92 (dd, 1H), 7.57 (dd, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.13 (dd, 1H), 6.78 (d, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (dt, 1H), 4.05 (dd, 1H), 3.82 (ddd, 1H), 3.67-3.44 (m, 4H), 3.25 (dd, 1H), 3.24-3.09 (m, 1H), 2.98 (dd, 1H), 2.06-1.74 (m, 2H), 0.97-0.88 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS ($M+H$)⁺: 556.1.

[0142] 단계 2. 3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴

[0143] 3-(1-[1,3]옥사졸로[5,4-b]페리딘-2-일페롤리딘-3-일)-3-[4-(7-[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로판니트릴 (5.35 g, 9.63 mmol, 단계 1의 방법에 의해 제조됨)을 DCM과 TFA의 2:1 혼합물 (60 mL)에서 6시간 동안 교반하였다. 용매를 회전 증발에 의해 제거하였다. 조잔류물을 EDA (5.15 mL, 77.0 mmol)를 함유하는 메탄올 (50 mL)에 용해시켜, 하룻밤 동안 교반하였다. 용매 제거 후에, 생성물을 0 내지 15% MeOH/DCM의 그레이디언트로 용리되는 실리카 젤 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다 (3.59 g, 88%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.72 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.89 (dd, 1H), 7.54 (dd, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.12 (dd, 1H), 6.75 (d, 1H), 4.56 (dt, 1H), 4.01 (dd, 1H), 3.80 (ddd, 1H), 3.60 (ddd, 1H), 3.48 (dd, 1H), 3.26 (dd, 1H), 3.21-3.06 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H), 2.03-1.76 (m, 2H); LCMS ($M+H$)⁺: 426.1.

[0144] 실시예 3. 4-[4-(3-시아노-2-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]프로필)페페라진-1-일]카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 트라이플루오로아세테이트 염 (분리된 단일 거울상 이성질체)



[0145]

단계 1. (R)- 및 (S)- *tert*-부틸 4-(3-시아노-2-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]프로필)피페라진-1-카르복실레이트

[0147]

1,8-다이아자바이사이클로[5.4.0]운데스-7-엔 (5.5 mL, 0.037 mol)을 아세토니트릴 (70 mL) 중의 (E)- 및 (Z)-*tert*-부틸 4-(3-시아노알릴)피페라진-1-카르복실레이트 (11.1 g, 0.0441 mol, US 2011/0059951의 실시예 1, 단계 1 내지 2에서와 같이 제조됨) 및 4-(1H-피라졸-4-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘 (11.6 g, 0.0368 mol, WO2007/070514, 실시예 65에 기재된 바와 같이 제조됨)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 50°C에서 15시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하였다. 잔류물을 아세트산에틸에 용해시켜, 물 (3회), 염수 (1회)로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시켜, 농축시켰다. 플래시 컬럼 크로마토그래피, 이어서 분취용 HPLC-MS (0.15% NH₄OH를 함유하는 MeCN/H₂O의 그래디언트로 용리됨)로, 백색 품 (8.20 g, 39%)으로서의 생성물을 얻었다.

[0148]

키랄 HPLC를 사용하여, 라세미 혼합물을 단일 거울상 이성질체로 분리하였다 (페노메넥스 럭스 (Phenomenex Lux)-셀룰로오스 (Cellulose)-2, 21.2 × 250 mm, 5 μm, 20 mL/min으로 30% EtOH/70% 헥산으로 용리됨). 피크 1 (첫 번째로 용출됨): 4.0 g 및 피크 2 (두 번째로 용출됨): 4.0 g. ¹H NMR 피크 1 (400 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 6.79 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.70-4.62 (m, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.44-3.35 (br m, 4H), 3.16 (dd, 1H), 3.10 (dd, 1H), 2.99 (dd, 1H), 2.89 (dd, 1H), 2.50-2.40 (br m, 4H), 1.44 (s, 9H), 0.95-0.89 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 567.3. ¹H NMR 피크 2 (400 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 6.79 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.70-4.62 (m, 1H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.45-3.34 (br m, 4H), 3.16 (dd, 1H), 3.10 (dd, 1H), 2.99 (dd, 1H), 2.90 (dd, 1H), 2.50-2.40 (br m, 4H), 1.44 (s, 9H), 0.95-0.89 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS (M+H)⁺: 567.3.

[0149]

단계 2. 4-피페라진-1-일-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]부탄니트릴 하이드로클로라이드 염

[0150]

tert-부틸 4-(3-시아노-2-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]프로필)피페라진-1-카르복실레이트 (4.0 g, 7.0 mmol; 단계 1의 피크 2)를 1,4-다이옥산 (40 mL)에 용해시켜, 다이옥산 중의 4.0 M HCl (25 mL, 100 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 80분간 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 하이드로클로라이드 염으로서의 생성물을 얻었다. LCMS (M+H)⁺: 467.3.

[0151]

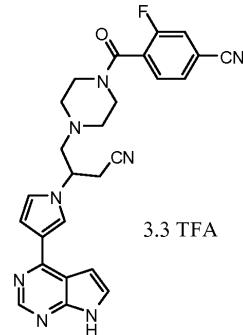
단계 3. 4-[(4-(3-시아노-2-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]프로필)피페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 트라이플루오로아세테이트 염

[0152]

THF (10.0 mL) 중의 4-시아노-2-플루오로벤조산 (138 mg, 0.836 mmol, 알파에이사 (Alfa Aesar)), N,N,N',N'-테트라메틸-0-(7-아자벤조트라이아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트 (254 mg, 0.669 mmol) 및 트라이에틸아민 (0.466 mL, 3.34 mmol)의 혼합물을 실온에서 15분간 교반하였다. 4-피페라진-1-일-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]부탄니트릴 하이드로클로라이드 (0.33 g, 0.56 mmol; 단계 2)를 첨가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 아세트산에틸 및 물로 희석하였다. 층을 분리하여, 유기층을 연속적으로 물, 0.1N NaOH 및 염수로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시켜, 농축시켰다. 잔류물을 2:1 DCM:TFA 혼합물에 용해시켜, 3시간 동안 교반하고, 농축시킨 다음에, 에틸렌다이아민 0.8 mL를 8 mL 메탄올에 첨가한 혼합물에 용해시켰다. 1시간 동안 교반한 후, 생성물을 0.2% TFA를 함유하는 MeCN/H₂O의 그래디언트로 용리되는 HPLC-MS로 정제하였다. 용리액을 냉동시키고 동결 건조시켜, 백색

분말 (200 mg, 47%)을 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-dmso}$): δ 12.64 (br s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.99 (dd, 1H), 7.82–7.76 (m, 2H), 7.61 (t, 1H), 7.15–7.11 (m, 1H), 5.13 (br m, 1H), 3.82–2.37 (br, 12H); ^{19}F NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-dmso}$): δ -74.97 (s, 7.2 F), -114.49 (br s, 1F); LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 484.2.

[0153] 실시예 4. 4-[4-(3-시아노-2-[3-(7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 트라이플루오로아세테이트 염 (분리된 단일 거울상 이성질체)



[0154]

[0155] 단계 1. *tert*-부틸 4-(3-시아노-2-[3-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]프로필}파페라진-1-카르복실레이트

[0156]

N,N-다이메틸포름아미드 (25 mL) 중의 (E)- 및 (Z)-*tert*-부틸 4-(3-시아노알릴)파페라진-1-카르복실레이트 (4.0 g, 0.016 mol; US 2011/0059951의 실시예 1, 단계 1 내지 2에서와 같이 제조됨)와 4-(1H-피롤-3-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘 (4.2 g, 0.013 mol, WO2009/114512, 실시예 82에서와 같이 제조됨)의 혼합물에, 탄산칼륨 (5.540 g, 0.0401 mol)을 첨가하였다. 혼합물을 60°C에서 17시간 동안 교반하였다. 추가의 (E)- 및 (Z)-*tert*-부틸 4-(3-시아노알릴)파페라진-1-카르복실레이트 (4.0 g, 0.016 mol)를 첨가하여, 반응물을 60°C에서 24시간 동안 교반하였다. 추가 부분의 (E)- 및 (Z)-*tert*-부틸 4-(3-시아노알릴)파페라진-1-카르복실레이트 (4.0 g, 0.016 mol)를 첨가하였다. 3일 밤 동안 가열한 후에, 대부분의 출발 물질은 LCMS로 측정된 바와 같이, 원하는 생성물로 전환되었다. 그 다음에 혼합물을 여과하여, EtOAc로 희석하고, 물 (3회), 염수 (1회)로 세정하여, 황산나트륨으로 건조시키고, 디캔테이션하여, 농축시켰다. 분취용 HPLC-MS (0.15% NH_4OH 를 함유하는 $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 의 그래디언트로 용리됨)로 정제하여, 갈색 폼 (4.20 g, 55%)을 얻었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.81 (s, 1H), 7.66 (t, 1H), 7.34 (d, 1H), 6.97 (dd, 1H), 6.89 (t, 1H), 6.84 (d, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.47–4.36 (m, 1H), 3.57–3.50 (m, 2H), 3.45–3.37 (m, 4H), 3.06 (dd, 1H), 3.00–2.90 (m, 2H), 2.83 (dd, 1H), 2.57–2.35 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 0.96–0.86 (m, 2H), -0.06 (s, 9H); LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 566.3.

[0157]

키랄 HPLC를 사용하여, 라세미체를 단일 거울상 이성질체로 분리하였다 (키랄 테크놀러지즈 키랄팍 (ChiralPAK) IA 20×250mm, 5 μm , 이동상 30%EtOH/70%헥산, 유량 12 mL/min). 피크 1 (첫 번째로 용출된 거울상 이성질체), 1.8 g; 피크 2 (두 번째로 용출된 거울상 이성질체): 1.9 g.

[0158]

단계 2. 4-파페라진-1-일-3-[3-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]부탄니트릴 하이드로클로라이드 염

[0159]

1,4-다이옥산 (20 mL) 중의 *tert*-부틸 4-(3-시아노-2-[3-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]프로필}파페라진-1-카르복실레이트 (1.9 g, 0.0034 mol; 단계 1의 피크 2)의 용액에, p-다이옥산 중의 4.0 M HCl (12 mL, 48 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 80분간 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 담황색 고체 (1.90 g, 100%)로서의 생성물을 얻었다. LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 466.3.

[0160]

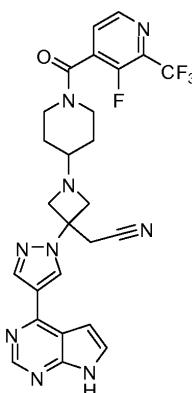
단계 4-[4-(3-시아노-2-[3-(7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]프로필}파페라진-1-일)카르보닐]-3-플루오로벤조니트릴 트라이플루오로아세테이트 염

[0161]

THF (2.4 mL) 중의 4-시아노-2-플루오로벤조산 (44 mg, 0.26 mmol, 알파에이사), N,N,N',N'-테트라메틸-0-

(7-아자벤조트라이아졸-1-일)우로늄 혼합물을 실온에서 15분간 교반하였다. 4-피페라진-1-일-3-[3-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-피롤-1-일]부탄니트릴 하이드로클로라이드 염 (110 mg, 0.20 mmol; 단계 2)을 첨가하였다. 반응물을 2시간 동안 교반하였다. 아세트산에틸 및 물을 첨가하였다. 층을 분리하여, 유기층을 연속적으로 물, 1N NaOH 및 염수로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시켜, 농축시켰다. 잔류물을 먼저, DCM:TFA의 1:1 혼합물에 1시간 동안 용해시켜, 농축시킨 다음에, 에틸렌다이아민 (0.2 mL)을 함유하는 메탄올 (2 mL)에서 1시간 동안 교반하였다. 분취용 HPLC-MS (0.1% TFA를 함유하는 MeCN/H₂O의 그레이디언트로 용리됨)로 정제하여, 3.3xTFA 염 (84 mg, 48%)으로서의 생성물을 얻었다 ¹H NMR (300 MHz, d₆-dmsol): δ 13.22 (br s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.00 (dd, 1H), 7.97-7.93 (m, 1H), 7.80 (dd, 1H), 7.61 (t, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.18-7.13 (m, 1H), 5.00-4.80 (m, 1H), 3.75-3.49 (br m, 2H), 3.35-2.33 (m, 10H); ¹⁹F NMR (300 MHz, d₆-dmsol): δ -74.82 (s, 10F), -114.53 (s, 1F); LCMS (M+H)⁺: 483.2.

[0162] 실시예 5. {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]파페리딘-4-일}-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴



[0163]

[0164] 단계 A: *tert*-부틸 3-옥소아제티딘-1-카르복실레이트

[0165]

0°C에서 *tert*-부틸 3-하이드록시아제티딘-1-카르복실레이트 (10.0 g, 57.7 mmol), 다이메틸 셀록사이드 (24.0 mL, 338 mmol), 트라이에틸아민 (40 mL, 300 mmol) 및 염화메틸렌 (2.0 mL)의 혼합물에, 삼산화황-파리딘 복합체 (40 g, 200 mmol)를 조금씩 첨가하였다. 혼합물을 3시간 동안 교반하고, 염수로 켄칭 (quenching)하여, 염화메틸렌으로 추출하였다. 합한 추출물을 무수 Na₂SO₄로 건조시켜, 여과하여, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 걸 켈럼 (헥산 중의 0 내지 6% 아세트산에틸 (EtOAc))으로 정제하여, *tert*-부틸 3-옥소아제티딘-1-카르복실레이트 (5.1 g, 52% 수율)를 얻었다.

[0166]

단계 B: *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카르복실레이트

[0167]

질소 분위기 하에, 교반 막대, 격막, 질소 인렛, 250 mL 첨가 깔때기 및 열전대가 부착된 오븐 건조된 1 L 4구 등근 바닥 플라스크에, 수소화나트륨 (5.6 g, 0.14 mol) 및 테트라하이드로푸란 (THF) (140 mL)을 주입하였다. 혼합물을 3°C로 냉각시킨 다음에, 시린지를 통해 20분간에 걸쳐서 다이에틸 시아노메틸포스포네이트 (22.4 mL, 0.138 mol)를 적하 주입하였다. 용액은 담황색 슬러리가 되었다. 그 다음에 반응물을 18.2°C로 가온하면서 75분간 교반하였다. 테트라하이드로푸란 (280 mL) 중의 *tert*-부틸 3-옥소아제티딘-1-카르복실레이트 (20 g, 0.1 mol)의 용액을 오븐 건조된 등근 바닥 플라스크에 준비하여, 캐뉼러를 통해 첨가 깔때기로 주입한 다음에, 25분간에 걸쳐서 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 용액은 색상이 적색으로 되었다. 반응물을 하룻밤 동안 교반하였다. 반응물을 24시간 후에 TLC (70% 헥산/EtOAc)로 체크하였더니, 완료된 것으로 나타났다. 반응물을 20% 염수 200 mL 및 EtOAc 250 mL로 희석하였다. 용액을 분배하여, 수상을 EtOAc 250 mL로 추출하였다. 합한 유기상을 MgSO₄로 건조시켜, 여과하고, 감압 하에 증발시켜, 플래시 크로마토그래피 (0% 내지 20% EtOAc/헥산, 150 g 플래시 켈럼)로 정제하여, 원하는 생성물, *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카르복실레이트 (15 g, 66.1% 수율)를 얻었다.

[0168]

단계 C: 4-클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘

- [0169] -5°C (얼음/염 욕)에서 N,N-다이메틸아세트아미드 (118 mL) 중의 수소화나트륨 (36.141 g, 903.62 mmol)의 혼탁액에, N,N-다이메틸아세트아미드 (237 mL) 중의 4-클로로페롤로[2,3-d]파리미딘 (119.37 g, 777.30 mmol)의 절은 용액을 서서히 첨가하였다. 플라스크 및 첨가 깔때기를 N,N-다이메틸아세트아미드 (30 mL)로 런스하였다. 다량의 가스가 즉시 방출되었다. 혼합물을 약간 탁한 오렌지색 혼합물을 되었다. 혼합물을 0°C 에서 60분간 교반하여, 담갈색 불투명한 혼합물을 얻었다. 혼합물에 [2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸 클로라이드 (152.40 g, 914.11 mmol)를 서서히 첨가하여, 반응물을 0°C 에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 H_2O 12 mL를 서서히 첨가하여 켄칭하였다. 추가의 물 (120 mL), 이어서 메틸 *tert*-부틸 에테르 (MTBE) (120 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 10분간 교반하였다. 유기층을 분리하였다. 수층을 또 하나의 부분의 MTBE (120 mL)로 추출하였다. 유기 추출물을 합해, 염수 (120 mL \times 2)로 세정하고, 감압 하에 농축시켜, 다크 오일로서의 조생성물 4-클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘을 얻었다. 수율: 85.07 g (97%); LC-MS: 284.1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺. 추가의 정제없이 다음 반응으로 전달하였다.
- [0170] 단계 D: 4-(1H-파라졸-4-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘
- [0171] 1000 mL 등근 바닥 플라스크에, 4-클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘 (10.00 g, 35.23 mmol), 1-부탄올 (25.0 mL), 1-(1-에톡시에틸)-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-다이옥사보롤란-2-일)-1H-파라졸 (15.66 g, 52.85 mmol), 물 (25.0 mL) 및 탄산칼륨 (12.17 g, 88.08 mmol)을 주입하였다. 이러한 용액을 4회 탈가스하여, 매회마다 질소로 채웠다. 상기 용액에 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0) (4.071 g, 3.523 mmol)을 첨가하였다. 상기 용액을 4회 탈가스하여, 매회마다 질소로 채웠다. 혼합물을 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후에, 혼합물을 셀라이트 베드를 통해 여과하고, 셀라이트를 아세트산에틸 (42 mL)로 런스하였다. 여과액을 합해, 유기층을 분리하였다. 수층을 아세트산에틸로 추출하였다. 유기 추출물을 합해, 30 내지 70 $^{\circ}\text{C}$ 의 옥 온도로 진공 하에 농축시켜, 최종 화합물 4-(1H-파라졸-4-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘을 얻었다. 수율: 78%. LC-MS: 316.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.
- [0172] 단계 E: *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-카르복실레이트
- [0173] 오버헤드 교반기, 격막 및 질소 인렛이 부착된 2 L 등근 바닥 플라스크에, *tert*-부틸 3-(시아노메틸렌)아제티딘-1-카르복실레이트 (9.17 g, 0.0472 mol), 4-(1H-파라졸-4-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘 (14.9 g, 0.0472 mol) 및 아세토니트릴 (300 mL)을 주입하였다. 얻어진 용액은 불균일하였다. 실온에서 3분간에 걸쳐서 시린지를 통해 용액에 1,8-다이아자바이사이클로[5.4.0]운데스-7-엔 (8.48 mL, 0.0567 mol)을 조금씩 첨가하였다. 용액은 서서히 균일해지고 색상이 황색으로 되었다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. HPLC 및 LC/MS에 의한 바, 반응이 완료되었고, 반응물을 회전 증발에 의해 농축시켜, 아세토니트릴 (~150 mL)을 제거하였다. EtOAc (100 mL), 이어서 20% 염수 100 mL를 첨가하였다. 2 개의 상을 분배하였다. 수상을 EtOAc 150 mL로 추출하였다. 합한 유기상을 MgSO_4 로 건조시켜, 여과하고, 농축시켜, 오렌지색 오일을 얻었다. 플래시 크로마토그래피 (150 g 실리카, 60% EtOAc/헥산, CH_2Cl_2 로 채워짐)로 정제하여, 황색 오일 (21.1 g, 88% 수율)로서의 표제 화합물 *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-카르복실레이트를 얻었다. LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 510.3$.
- [0174] 단계 F: {3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클로라이드
- [0175] THF 10 mL 중의 *tert*-부틸 3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-카르복실레이트 (2 g, 3.9 mmol)의 용액에, 다이옥산 중의 4 N HCl 10 mL를 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 진공 중에서 농축시켜, 백색 분말 고체로서의 표제 화합물 1.9 g (99%)을 얻어, 추가의 정제없이 다음 반응에 사용하였다. LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 410.3$.
- [0176] 단계 G: *tert*-부틸 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}피페리딘-1-카르복실레이트
- [0177] THF (30 mL) 중의 {3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-

1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 디아하이드로클로라이드 (2.6 g, 6.3 mmol), *tert*-부틸 4-옥소-1-피페리딘카르복실레이트 (1.3 g, 6.3 mmol)의 용액에, N,N-다이아이소프로필에틸아민 (4.4 mL, 25 mmol) 및 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드 (2.2 g, 10 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 염수 20 mL를 첨가한 후에, 용액을 EtOAc로 추출하였다. 추출물을 무수 Na_2SO_4 로 건조시켜, 농축시켰다. 잔류물을 헥산 중의 30 내지 80% EtOAc로 용리되는 콤비플래시 (combiflash) 컬럼으로 정제하여, 원하는 생성물, *tert*-부틸 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}피페리딘-1-카르복실레이트를 얻었다. 수율: 3.2 g (86%); LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 593.3$.

[0178] 단계 H: {1-피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트라이하이드로클로라이드

[0179] THF 10 mL 중의 *tert*-부틸 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}피페리딘-1-카르복실레이트 (3.2 g, 5.4 mmol)의 용액에, 다이옥산 중의 4 N HCl 10 mL를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 감압 하에 용매를 제거하여, 백색 분말 고체로서의 {1-피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트라이하이드로클로라이드 3.25 g (100%)을 얻어, 다음 반응에서 직접 사용하였다. LC-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 493.3$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.42 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 5.68 (s, 2H), 4.96 (d, 2H), 4.56 (m, 2H), 4.02-3.63 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.53 (t, 2H), 3.49-3.31 (3, 3H), 2.81 (m, 2H), 2.12 (d, 2H), 1.79 (m, 2H), 0.83 (t, 2H), -0.10 (s, 9H).

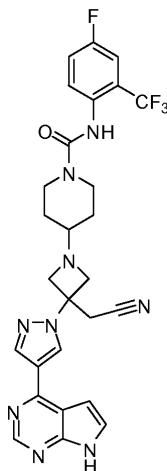
[0180] 단계 I: {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴

[0181] 다이메틸포름아미드 (DMF) (20.0 mL) 중의 {1-피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트라이하이드로클로라이드 (1.22 g, 2.03 mmol), 3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코틴산 (460 mg, 2.2 mmol), 벤조트라이아졸-1-일옥시트리스(다이메틸아미노)포스포늄 혼합물로포스페이트 (1.07 g, 2.42 mmol) 및 트라이에틸아민 (2.0 mL, 14 mmol)의 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. LS-MS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. EtOAc (60 mL) 및 포화 NaHCO_3 수용액 (60 mL)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 실온에서 10분간 교반한 후에, 유기상을 분리하여, 수층을 EtOAc로 3회 추출하였다. 합한 유기상을 염수로 세정하여, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하여, 감압 하에 증발시켰다. 플래시 크로마토그래피로 정제하여, 원하는 생성물 {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴을 얻었다. LC-MS: 684.3 ($\text{M}+\text{H}]^+$).

[0182] 단계 J: {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴

[0183] 염화메틸렌 (1.5 mL) 중의 {1-{1-[3-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)아이소니코티노일]피페리딘-4-일}-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 (56 mg, 0.1 mmol)의 용액에, 트라이플루오로아세트산 (1.5 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거한 후에, 잔류물을 20% 에틸렌다이아민을 함유하는 메탄을 용액에 용해시켰다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후에, 용액을 HPLC (방법 B)로 정제하여, 표제 화합물을 얻었다. LC-MS: 554.3 ($\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 9.71 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.55 (d, $J=4.6$ Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.52 (t, $J=4.6$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, 1H), 6.77 (dd, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=0.7$ Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.63 (dd, $J_1=7.8$ Hz, $J_2=3.7$ Hz, 2H), 3.45 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.11 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.40 (m, 1H).

[0184] 실시예 6. 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드



[0185]

단계 A: 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드

[0187]

테트라하이드로포란 (30 mL) 중의 {1-피페리딘-4-일-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트라이하이드로클로라이드 (500 mg, 1 mmol)의 용액에, 트라이에틸아민 (0.29 g, 2.8 mmol) 및 4-플루오로-1-아이소시아나토-2-(트라이플루오로메틸)벤젠 (190 mg, 0.95 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 30 내지 100% EtOAc/헥산을 사용한 콤비플래시로 정제하여, 분말로서의 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드를 얻었다. LC-MS: 698.1 ($M+H$)⁺.

[0188]

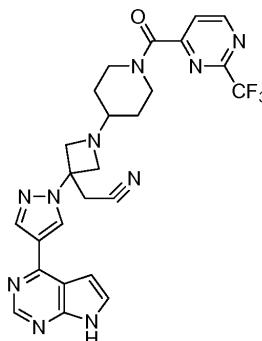
단계 B: 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드

[0189]

4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드 (210 mg, 0.3 mmol)를 염화메틸렌 (20 mL) 중의 50 M 트라이플루오로아세트산 용액에 용해시켰다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후에, 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 메탄올 (20 mL) 및 에틸렌다이아민 (1.0 g, 17 mmol)에 용해시켰다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후에, 혼합물을 HPLC (방법 B)로 정제하여, 백색 분말로서의 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-[4-플루오로-2-(트라이플루오로메틸)페닐]피페리딘-1-카르복스아미드를 얻었다. LC-MS: 568.1 ($M+H$)⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 12.10 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.55 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.01 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.67 (d, $J=8$ Hz, 2H), 3.51 (m, 4H), 2.92 (m, 2H), 2.38 (m, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.09 (m, 2H).

[0190]

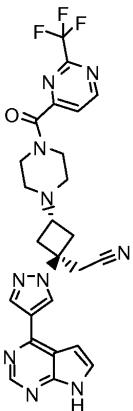
실시예 7. [3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]-1-(1-{[2-(트라이플루오로메틸)피리미딘-4-일]카르보닐}피페리딘-4-일)아제티딘-3-일]아세토니트릴



[0191]

[0192] 표제 화합물을 실시예 5를 제조하는데 사용한 것과 유사한 방법에 의해 제조하였다. LC-MS ($M+H$)⁺: 537.2.

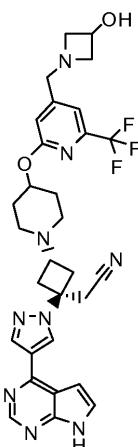
[0193] 실시예 8. [트랜스-1-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]-3-(4-{[2-(트라이플루오로메틸)피리미딘-4-일]카르보닐}피페라진-1-일)사이클로부틸]아세토니트릴



[0194]

[0195] 테트라하이드로푸란 (6 mL) 중의 2-(트라이플루오로메틸)피리미딘-4-카르복실산 (0.225 g, 1.17 mmol, WO2006/067445에 기재된 바와 같이 아폴로 (Apollo)로부터 입수된 메틸 에스테르의 가수분해에 의해 제조됨), N,N',N'-테트라메틸-0-(7-아자벤조트라이아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트 (0.29 g, 0.76 mmol, 알드리치 (Aldrich)) 및 트라이에틸아민 (0.26 mL, 1.9 mmol)의 혼합물을 15분간 예비교반한 후에, 테트라하이드로푸란 (10 mL) 중의 {트랜스-3-피페라진-1-일-1-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴 (0.188 g, 0.380 mmol, US 2012/0149681의 실시예 1b, 단계 1에서와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 반응물을 하룻밤 동안 교반하였다. THF를 진공 중에서 제거하였다. 잔류물을 포화 중탄산나트륨과 아세트산에틸에 분배하였다. 수성 부분을 총 3회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 황산나트륨으로 건조시키고, 디캔테이션하여, 농축시켰다. DCM 중의 0 내지 10% MeOH의 그레디언트로 용리되는 플래시 크로마토그래피를 사용하여, SEM 보호된 중간체를 정제하였다. 먼저, 염화메틸렌 (10 mL) 중에서 트라이플루오로아세트산 (10 mL)과 함께 2시간 동안 교반한 후에, 용매를 진공 중에서 증발시킨 다음에, 에틸렌다이아민 (0.5 mL, 7 mmol)을 함유하는 메탄올 (6 mL, 200 mmol)과 함께 하룻밤 동안 교반하여 탈보호를 행하였다. 반응 혼합물을 물과 아세트산에틸에 분배하여, 수성 부분을 아세트산에틸로 추가로 2회 추출하였다. 합한 추출물을 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하여, 농축시켰다. DCM 중의 0 내지 10% MeOH의 그레디언트로 용리되는 플래시 크로마토그래피를 사용하여, 생성물을 정제하였다. 생성물을 분취용 HPLC-MS (C18, 0.1% TFA를 함유하는 H₂O/MeCN의 그레디언트로 용리)로 다시 정제하였다. 아세토니트릴을 원하는 매스를 함유하는 용리액으로부터 회전 증발에 의해 제거한 다음에, 잔류 수용액을 중탄산나트륨을 첨가하여 중화시키고, 아세트산에틸로 수회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하여, 농축시켰다. 생성물을 분취용 HPLC-MS (C18, 0.15% NH₄OH를 함유하는 H₂O/MeCN의 그레디언트로 용리)로 다시 정제하였다. 원하는 매스를 함유하는 용리액을 냉동시키고 동결 건조시켜, 유리 염기 (99 mg, 48%)로서의 생성물을 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 9.13 (d, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 6.98 (d, 1H), 3.89-3.81 (m, 2H), 3.59-3.52 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.97 (tt, 1H), 2.59-2.42 (m, 6H); ¹⁹F NMR (282 MHz, CD₃OD): δ -72.43 (s, 3F); LCMS ($M+H$)⁺: 537.0.

[0196] 실시예 9. {트랜스-3-(4-{[4-[(3-하이드록시아제티딘-1-일)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)피리딘-2-일]옥시}피페리딘-1-일)-1-[4-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴

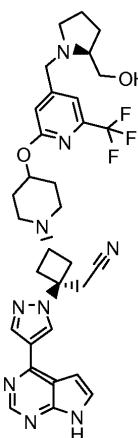


[0197]

[0198] 치환 단계에서 N,N-다이아이소프로필에틸아민 ($64 \mu\text{L}$, 0.37 mmol) 및 아제티딘-3-올 하이드로클로라이드 (30 mg , 0.3 mmol , 오크우드 (Oakwood))를 사용하여, US 2012/0149681의 실시예 153의 절차를 행하였다. 실온에서 하룻밤 동안 교반한 후에, 메탄올 (0.20 mL)을 첨가하여 균일 용액을 얻어, 실온에서 추가로 2.5시간 동안 교반하고, US 2012/0149681의 실시예 153에 주어진 탈보호 및 정제 조건에 따라 처리하여, 유리 염기 (9.7 mg , 44%)로서의 생성물을 얻었다. ^1H NMR (400 MHz , dmso) δ 12.12 (br s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.34 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H), 5.05 – 4.77 (m, 1H), 4.19 (h, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.50 (td, $J = 6.1, 2.0 \text{ Hz}$, 2H), 3.40 (s, 2H), 3.06 – 2.92 (m, 2H), 2.86 – 2.71 (m, 3H), 2.68 – 2.53 (m, 2H), 2.38 – 2.22 (m, 2H), 2.22–2.07 (br m, 2H), 2.05–1.95 (br m, 2H), 1.75 – 1.48 (m, 2H); ^{19}F NMR (376 MHz , dmso) δ –67.36 (s); LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 608.2.

[0199]

실시예 10. {트랜스-3-(4-{{[4-{{[(2S)-2-(하이드록시메틸]페롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸]페리딘-2-일]옥시}페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴

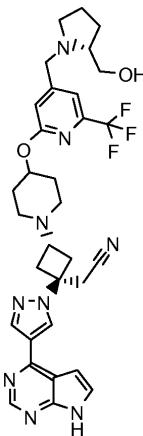


[0200]

[0201] 메실레이트와 아민과의 치환반응을 (2S)-페롤리딘-2-일메탄올 ($20 \mu\text{L}$, 0.2 mmol , 알드리치)을 사용하여 실온에서 하룻밤 동안 행하는 것을 제외하고는, US 2012/0149681의 실시예 158의 방법을 행하였다 (8.3 mg , 59%). ^1H NMR (500 MHz , DMSO) δ 12.09 (br s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 3.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 3.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.00 (tt, $J = 8.4, 3.9 \text{ Hz}$, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.12 (d, $J = 14.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.45 (d, $J = 15.0 \text{ Hz}$, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.42–3.25 (m, 2H), 3.06 – 2.97 (m, 2H), 2.87 – 2.77 (m, 2H), 2.69 – 2.62 (m, 2H), 2.59 (dddd, $J = 5.8, 5.8, 5.8, 8.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 3H), 2.08 – 1.95 (m, 2H), 1.83 (dddd, $J = 8.1, 8.1, 8.3, 12.2 \text{ Hz}$, 1H), 1.75 – 1.46 (m, 5H); ^{19}F NMR (376 MHz , dmso) δ –67.24 (s); LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 636.3.

[0202]

실시예 11. {트랜스-3-(4-{{[4-{{[(2R)-2-(하이드록시메틸]페롤리딘-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸]페리딘-2-일]옥시}페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴

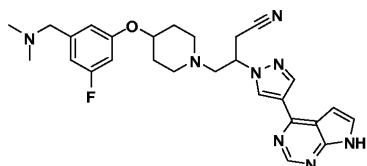


[0203]

[0204] 메실레이트와 아민과의 치환반응을 $(2R)$ -피롤리딘-2-일메탄올 (20 μL , 0.2 mmol, 알드리치)을 사용하여 실온에서 하룻밤 동안 행하는 것을 제외하고는, US 2012/0149681의 실시예 158의 방법을 행하였다 (8.3 mg, 59%). ^1H NMR (400 MHz, dmso) δ 12.14 (br s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 5.04 – 4.94 (m, 1H), 4.52 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.12 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 3.52 – 3.22 (m, 5H), 3.09 – 2.92 (m, 2H), 2.86 – 2.73 (m, 2H), 2.70 – 2.53 (m, 3H), 2.42 – 2.27 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 3H), 2.06 – 1.87 (m, 2H), 1.82 (dd, J = 8.0, 8.0, 8.4, 11.9 Hz, 1H), 1.77 – 1.37 (m, 5H); ^{19}F NMR (376 MHz, dmso) δ -67.24 (s); LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 636.3.

[0205]

실시예 12. 4-(4-{3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페녹시}피페리딘-1-일)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]부탄니트릴 (키랄)



[0206]

[0207] 단계 1. 3-플루오로-5-하이드록시벤즈알데하يد

[0208]

-78 $^{\circ}\text{C}$ 에서 톨루엔 (60.0 mL) 중의 3-플루오로-5-하이드록시벤조니트릴 (1.00 g, 7.29 mmol)의 혼탁액에, 톨루엔 중의 1.0 M 다이아이소부틸알루미늄 하이드라이드 (18.2 mL, 18.2 mmol)를 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 -78 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 교반하고, 하룻밤 동안 실온으로 가온시켰다. 메탄올과 물의 1:1 혼합물 (10 mL)을 첨가하여, 35분간 교반하였다. 고체를 여과하여, 아세트산에틸로 세정하였다. 여과액을 물 및 염수로 세정한 다음에, Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하여, 농축시켰다. 조생성물을 실리카 겔 컬럼 (10 내지 50% 아세트산에틸/헥산으로 용리)으로 정제하여, 원하는 생성물 (0.77 g, 75%)을 얻었다. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 10.49 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.10 (m, 2H), 6.87 (d, 1H).

[0209]

단계 2. 3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페놀

[0210]

염화메틸렌 (9.0 mL) 중의 다이메틸아민 하이드로클로라이드 (160 mg, 1.96 mmol)와 3-플루오로-5-하이드록시벤즈알데하يد (250.0 mg, 1.784 mmol)의 혼합물에, 트라이에틸아민 ($323 \mu\text{L}$, 2.32 mmol) 및 나트륨 트라이아세토부로하이드라이드 수지 (1.1 g, 2.7 mmol)를 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 하룻밤 동안 교반한 다음에, 여과하여, 농축시켰다. 조생성물을 실리카 겔 컬럼 (0 내지 15% 메탄올/DCM으로 용리)으로 정제하여, 원하는 생성물 (0.21 g, 70%)을 얻었다. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 6.55 (m, 2H), 6.42 (d, 1H), 2.15 (s, 6H), 1.89 (s, 2H). LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 170.1.

[0211]

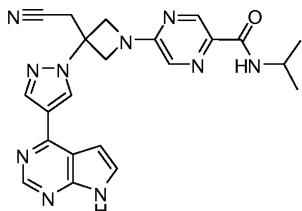
단계 3. 4-(4-{3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페녹시}피페리딘-1-일)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]부탄니트릴

[0212] 염화메틸렌 (9 mL) 중의 3-[(다이메틸아미노)메틸]-5-플루오로페놀 (158 mg, 0.934 mmol)의 혼합물에, 트라이페닐포스핀 수지 (578 mg, 1.37 mmol) 및 다이-*tert*-부틸 아조다이카르복실레이트 수지 (229 mg, 0.996 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 20분간 교반한 후에, 염화메틸렌 (2 mL) 중의 4-(4-하이드록시페리딘-1-일)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]부탄니트릴 (300 mg, 0.6 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 추가의 트라이페닐포스핀 수지 (0.5 g), 다이-*tert*-부틸 아조다이카르복실레이트 수지 (0.23 g) 및 DCM (8 mL)을 첨가하여, 추가로 2시간 동안 교반하였다. 바이알 및 수지를 DCM으로 세정하여, 여과하였다. 여과액을 10% NaOH 수용액으로 세정하였다. 유기 층을 $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과하여, 농축시켰다. 조생성물을 실리카 젤 컬럼 (0 내지 15% 메탄올/DCM으로 용리됨)으로 정제하여, SEM 보호된 생성물을 얻었다. LCMS ($M+H$)⁺: 633.5. 정제된 생성물에, 염화메틸렌 (1.5 mL) 및 트라이플루오로아세트산 (1.5 mL, 19 mmol)을 첨가하여, 2시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시킨 후에, 메탄올 (3.5 mL) 및 에틸렌다이아민 (0.70 mL, 10 mmol)을 첨가하였다. 얻어진 혼합물을 1시간 동안 교반한 다음에, 농축시켰다. 농축물을 DCM에 용해시켜, 물로 세정하고, Na_2SO_4 로 건조시켜, 여과하고, 농축시켜, 조생성물을 얻어, 키랄 prep-HPLC (키랄셀 OJ-H 컬럼, 4.6×250 mm, 5 μ , 60% 에탄올/Hex, 0.5 mL/min)로 정제하여, 2개의 거울상 이성질체를 얻었다.

[0213] 거울상 이성질체 1 (첫 번째로 용출됨): LCMS (M+H)⁺: 503.3.

[0214] 거울상 이성질체 2 (두 번째로 용출됨): ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.78 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 6.64 (t, 3H), 4.94 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.39 (m, 2H), 3.19 (d, 3H), 2.77 (m, 3H), 2.60 (m, 1H), 2.32 (m, 2H), 2.10 (s, 6H), 1.83 (m, 2H), 1.54 (m, 2H). LCMS ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 503.3.

[0215] 실시예 13. 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필페라진-2-카르복스아미드



[0216]

[0217] 단계 1: 메틸 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}페라진-2-카르복실레이트

[0218] 질소 하에 (R)-(+)-2,2'-비스(다이페닐포스피노)-1,1'-바이나프틸 (0.065 g, 0.10 mmol)을 툴루엔 (15.0 mL) 중의 {3-[4-(7-[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸)-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클로라이드 (0.50 g, 1.0 mmol), 메틸 5-클로로페라진-2-카르복실레이트 (0.18 g, 1.0 mmol)(아크 팜 인코포레이티드 (Ark Pharm, Inc.), Cat. #: AK-23920) 및 탄산세슘 (1.0 g, 3.1 mmol)의 혼합물에 첨가한 다음에, 아세트산팔라듐 (0.023 g, 0.10 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 120°C에서 3시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후에, 반응 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하여, 아세트산에틸로 정제하였다. 여과액을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 다이클로로메탄 중의 아세트산에틸 (0 내지 70%)을 사용하여 실리카 젤 컬럼 상에서 플래시 크로마토그래피로 정제하여, 원하는 생성물 (0.31 g, 55%)을 얻었다. LCMS ($M+H$)⁺ : m/z = 546.3.

[0219] 단계 2: 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}페라진-2-카르복실산

[0220] 메탄올 (6.0 mL) 및 물 (2.5 mL) 중의 메틸 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]-메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}파라진-2-카르복실레이트 (0.31 g, 0.57 mmol)와 수산화리튬 일수화물 (0.060 g, 1.4 mmol)의 혼합물을 30°C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 혼합물을 HCl 수용액으로 pH = 4로 조절하고, 감압 하에 농축시켜, MeOH를 제거하였다. 얻어진 고체를 여과하여, 물 및 에테르로 세정한 다음에, 진공 중에서 건조시켜, 원하는 생성물 (0.25 g, 83%)을 얻었다. LCMS ($M+H^+$) : m/z =

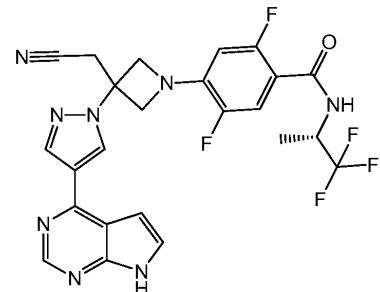
532.3

[0221] 단계 3: 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필파라진-2-카르복스아미드

[0222] 트라이에틸아민 (15 μ L, 0.11 mmol)을 염화메틸렌 (1.3 mL) 중의 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}파라진-2-카르복실산 (19.4 mg, 0.0365 mmol), 벤조트라이아졸-1-일옥시트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (19 mg, 0.044 mmol) 및 2-프로판아민 (3.2 mg, 0.055 mmol)의 혼합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 NaHCO_3 수용액으로 워크 업 (work up)하여, 염화메틸렌 (2 x 2 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 물 (1 mL)로 세정하여, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 추가의 정제없이 다음 단계에 사용하였다. LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$) : m/z = 573.3.

[0223] 염화메틸렌 (1.3 mL) 및 트라이플루오로아세트산 (0.6 mL)을 상기 중간체에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 메탄올 (1.3 mL)에 용해시켰다. 용액에 에틸렌다이아민 (0.086 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, RP-HPLC (pH = 10)로 정제하여, 원하는 생성물을 얻었다. LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$) : m/z = 443.2. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 8 12.15 (br, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.63 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 3.3, 2.4 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 3.4, 1.7 Hz, 1H), 4.81 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 4.53 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 4.13-4.02 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

[0224] 실시예 14. 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드



[0225]

단계 1: 4-클로로-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드

[0227] 0°C에서 4-클로로-2,5-다이플루오로벤조일 클로라이드 (29.6 mg, 0.140 mmol) (오크우드, Cat.#: 001628)를 다이클로로메틸렌 (4.0 mL) 중의 (2S)-1,1,1-트라이플루오로프로판-2-아민 하이드로클로라이드 (20.0 mg, 0.134 mmol) (신퀘스트 랩 (SynQuest Lab), Cat.#: 3130-7-S1)와 다이아이소프로필에틸아민 (58 μ L, 0.33 mmol)의 혼합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분간 교반하고, 포화 NaHCO_3 수용액으로 워크 업하여, 다이클로로메틸렌 (3 x 10 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 염수로 세정하고, MgSO_4 로 건조시켜, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 원하는 생성물을 얻어, 추가의 정제없이 다음 단계 반응에서 직접 사용하였다. LCMS ($\text{M}+\text{H}^+$) : m/z = 288.0/290.0.

[0228] 단계 2: 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드

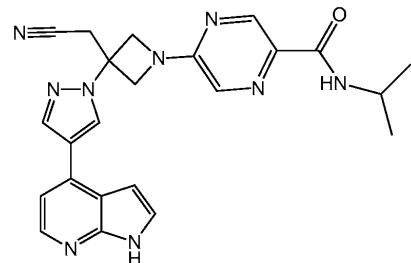
[0229] N_2 하에 (R)-(+)-2,2'-비스(다이페닐포스파노)-1,1'-바이나프틸 (8.3 mg, 0.013 mmol)을 톨루엔 (4.0 mL) 중의 {3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클로라이드 (65 mg, 0.13 mmol), 4-클로로-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드 (0.14 mmol) 및 탄산세슘 (0.13 g, 0.40 mmol)의 혼합물에 첨가한 후에, 아세트산팔라듐 (3.0 mg, 0.013 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 130°C에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후에, 혼합물을 물로 워크 업하여, 아세트산에틸 (3 x 10 mL)로 추출하였다. 합한

유기층을 염수로 세정하고, $MgSO_4$ 로 건조시켜, 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 조생성물을 얻어, 추가의 정제없이 다음 단계 반응에서 직접 사용하였다. LCMS ($M+H$)⁺: m/z = 661.2.

[0230] 단계 3: 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드

[0231] 0°C에서 N_2 하에 삼플루오르화붕소 에테레이트 (0.051 mL, 0.40 mmol)를 아세토니트릴 (1.0 mL) 중의 4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-2,5-다이플루오로-N-[(1S)-2,2,2-트라이플루오로-1-메틸에틸]벤즈아미드의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. (LCMS ($M+H$)⁺: m/z = 561.3). 그 다음에 혼합물을 0°C로 냉각시켜, 물 (0.13 mL)을 첨가하였다. 30분 후에, 0°C에서 5분간에 걸쳐서 5.0 M 수산화암모늄 수용액 (0.2 mL, 1 mmol)을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하고, RP-HPLC (pH = 10)로 정제하여, 원하는 생성물을 얻었다. LCMS ($M+H$)⁺: m/z = 531.0. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 12.62 (br, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.51 (dd, J = 8.8, 1.2 Hz, 1H), 7.78 (br, 1H), 7.35 (dd, J = 12.6, 6.5 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 11.9, 7.3 Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.70 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 4.44 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 1.30 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

[0232] 실시예 15. 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필피라진-2-카르복스아미드



[0233]

[0234] 단계 1: 메틸 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}피라진-2-카르복실레이트

[0235] N,N -다이아이소프로필에틸아민 (1.0 mL, 6.0 mmol)을 1,4-다이옥산 (15 mL) 중의 {3-[4-(1-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클라이드 (0.96 g, 2.0 mmol)와 메틸 5-클로로피라진-2-카르복실레이트 (0.34 g, 2.0 mmol)의 혼합물을 첨가하였다. 반응 혼합물을 120 °C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 워크 업하여, 다이클로로메틸렌 (3×20 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 염수로 세정하여, $MgSO_4$ 로 건조시키고, 여과하여, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 헥산 중의 아세트산에틸 (0 내지 60%)을 사용하여 실리카 겔 컬럼 상에서 플래시 크로마토그래피로 정제하여, 원하는 생성물 (0.13 g, 12%)을 얻었다. LCMS ($M+H$)⁺: m/z = 545.2.

[0236] 단계 2: 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}피라진-2-카르복실산

[0237] 메탄올 (4.0 mL), THF (2.0 mL) 및 물 (1.0 mL) 중의 메틸 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}피라진-2-카르복실레이트 (0.13 g, 0.24 mmol), 수산화리튬 일수화물 (0.025 g, 0.60 mmol)의 반응 혼합물을 40°C에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 2.0 N HCl 수용액으로 pH = 4로 조절하고, 감압 하에 농축시켜, MeOH 및 THF를 제거하였다. 생성된 침전물을 여과하여, 물 및 에테르로 세정하고, 진공 중에서 건조시켜, 원하는 생성물 (0.100 g, 79%)을 얻었다. LCMS ($M+H$)⁺: m/z = 531.4.

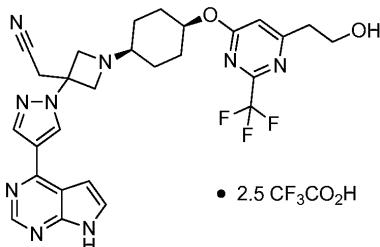
[0238] 단계 3: 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1H-피롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]아제티딘-1-일}-N-아이소프로필피라진-2-카르복스아미드

[0239] N,N -다이아이소프로필에틸아민 (19 μ L, 0.11 mmol)을 DMF (1.0 mL) 중의 5-{3-(시아노메틸)-3-[4-(1-{[2-(트

라이메틸실릴)에톡시]-1H-페롤로[2,3-b]페리딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-1-일}페라진-2-카르복실산 (19.4 mg, 0.0365 mmol), 벤조트라이아졸-1-일옥시트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (19 mg, 0.044 mmol) 및 2-프로판아민 (3.2 mg, 0.055 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO_3 수용액으로 워크 업하여, 다이클로로메틸렌 (3x 20 mL)으로 추출하였다. 합한 유기층을 염수로 세정하여, MgSO_4 로 건조시키고, 여과하여, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 염화메틸렌 (1.3 mL) 및 TFA (1.3 mL)로 처리하였다. 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하여, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 메탄올 (1.3 mL)에 용해시켜, 에틸렌다이아민 (0.086 mL, 1.3 mmol)으로 처리하였다. 얻어진 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 다음에, RP-HPLC (pH = 10)로 정제하여, 원하는 생성물을 얻었다. LCMS ($\text{M}+\text{H}$)⁺: m/z = 442.1. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 12.19 (br, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.66 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.32 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 3.2, 2.7 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 3.5, 2.7 Hz), 4.82 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 4.56 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.79 (s, 2H), 1.17 (d, J = 6.4 Hz, 6H).

[0240]

실시예 16: {1-(시스-4-{{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실}-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트리스(트라이플루오로아세테이트)



[0241]

단계 1: 다이에틸 [6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4일]말로네이트

[0243]

0°C에서 광유 (1.1 g, 28 mmol) 중의 테트라하이드로포란 (40 mL)과 NaH 의 혼합물에, 말론산에틸 (4.2 mL, 28 mmol)을 적가하였다. 그 다음에 4-클로로-6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘 (US 2013/0045963의 실시예 1, 단계 1에 기재됨) (3.75 g, 11.1 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 64°C에서 교반하였다. 3시간 후에, HPLC 및 LCMS 분석에 의하면, 반응이 70% 완료되었음을 나타내었다. 추가로 6시간 가열한 다음에, 20°C로 냉각시켰다. 단지 미량의 탈카르복실화 생성물이 생성되었다. 반응물을 중탄산염 수용액으로 희석하여, EtOAc 로 추출하였다. EtOAc 추출물을 염수로 세정하여, Na_2SO_4 로 건조시키고, 진공 중에서 증발시켜, 8.5 g 오일 (과잉량의 말론산에틸 및 광유를 포함)을 얻었다. 조생성물을 용매 A= 헥산; 용매 B= EtOAc ; 유량 60 mL/min; A, 3 min; 40% B의 그래디언트, 40 min; 254 nm로 세팅된 검출기; 수집한 47 mL 분획; 체류시간, 28 min을 사용하여 120 g 실리카 젤 컬럼 상에서 크로마토그래피로 정제하였다. 합한 분획을 증발시켜, 무색 오일 4.6 g (90% 수율)을 얻었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.05 (s, 1H); 5.30 (m, 1H, OCH); 4.85 (s, 1H, CH); 4.25 (m, 2H, OCH₂); 3.95 (s, 4H, OCH₂); 1.6-2.1 (m, 8H); 1.28 (t, 3H, CH₃).

[0244]

단계 2: 에틸 [6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4일]아세테이트

[0245]

다이에틸 [6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)페리미딘-4일]말로네이트 (4.60 g, 9.95 mmol)를 에탄올 (46 mL)에 용해시켰다. 물 (18 μL , 1.0 mmol) 및 에탄올 중의 21% 나트륨 에톡사이드 (0.37 mL, 1.0 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 75°C에서 1시간 동안 교반하였다. HPLC 및 LCMS 분석에 의하면, 60% 탈카르복실화를 나타내었다. 추가로 2시간 동안 계속해서 가열하였다 (반응 완료). 반응물을 중탄산염 수용액으로 희석하여, EtOAc 로 추출하였다. EtOAc 추출물을 염수로 세정한 다음에, 건조시키고 (Na_2SO_4), 진공 중에서 증발시켜, 3.4 g 오일 (88% 수율)을 얻었다. LCMS, HPLC 및 NMR에 의하면, 진행시키기에 충분히 깨끗한 것으로 나타났다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.20 (s, 1H); 5.20 (m, 1H, OCH); 4.10 (q, 2H, OCH₂); 3.89 (s, 2H, CH₂); 3.85 (s, 4H, OCH₂); 1.5-2.0 (m, 8H); 1.15 (t, 3H, CH₃). HPLC에 의하면, UV_{max} 222 및 252 nm을 갖는 것으로 나타났다.

[0246] 단계 3: 2-[6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]에탄올

에틸 [6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]아세테이트 (3.0 g)를 테트라하이드로푸란 (40 mL)에 용해시켜, 빙욕 중에서 냉각시켰다. 테트라하이드로붕산나트륨 (884 mg, 23.4 mmol), 이어서 메탄올 (4.8 mL, 120 mmol)을 조금씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 20분간 교반하고, 빙욕을 제거하여, 21°C에서 0.5시간 동안 교반하였다. HPLC 및 LCMS에 의하면, 잔류 에스테르는 나타나지 않고, 원하는 M+H 349로 전환되었음을 나타내며; 또한 몇몇의 과도 환원 생성물 (그 중 적어도 하나는 UV 흡광도를 갖지 않음)을 나타내었다. 반응 혼합물을 물로 켄칭하여, 중발시켰다. 반응 혼합물을 중탄산염 수용액 및 EtOAc로 회석하여, 0.5시간 동안 교반하였다. EtOAc 층을 염수로 세정하여, 건조시키고 (Na₂SO₄), 중발시켜, 3.0 g 오일을 얻었다. 생성물을 용매 A= 헥산; 용매 B= 3% iPA/EtOAc; 유량 60 mL/min; A, 3 min; 50% B의 그래디언트, 30 min, 이어서 50% B, 15 min; 254 nm로 세팅된 검출기; 수집한 47 mL 분획; 체류시간, 34 min을 사용하여 120 g 실리카 겔 컬럼 상에서 크로마토그래피로 정제하여, 중발시켜, 담황색 점성 오일 1.5 g (56% 수율)을 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ 7.10 (s, 1H); 5.20 (m, 1H, OCH); 4.71 (t, 1H, OH); 3.85 (s, 4H, OCH₂); 3.72 (q, 2H, OCH₂); 2.85 (t, 2H, CH₂); 1.5-2.0 (m, 8H).

[0248] 단계 4: 4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥사논

2-[6-(1,4-다이옥사스페로[4.5]데스-8-일옥시)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]에탄올을 아세톤 (60 mL, 900 mmol)에 용해시키고, 수중의 5.0 M 염화수소 (20 mL, 98 mmol)를 첨가하여, 17시간 동안 교반하였다. LCMS 및 HPLC 분석에 의해, M+H 305로 거의 완전히 전환되었음을 나타내었다. 중탄산염 수용액을 첨가하여, 반응 혼합물을 교반한 다음에, 농축시켰다. 이러한 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. EtOAc를 건조시키고 (Na₂SO₄), 진공 중에서 중발시켜, 1.3 g 담황색 점성 오일 (정제없이 다음 반응에서 사용함)을 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.80 (s, 1H); 5.60 (m, 1H, OCH); 4.06 (t, 2H, OCH₂); 3.04 (t, 2H, CH₂); 2.61 (m, 2H); 2.45 (m, 2H); 2.25 (m, 2H).

[0250] 단계 5: {1-(4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴

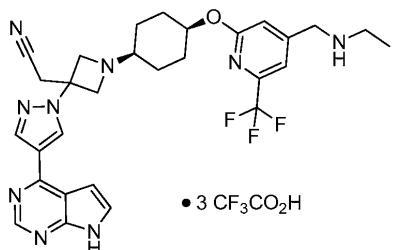
건조 테트라하이드로푸란 (36 mL) 중의 {3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클로라이드 (1.9 g, 3.9 mmol) 및 4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥사논 (1.3 g, 4.3 mmol)을 질소 하에 15분간 교반하였다. 그 다음에 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드 (1.7 g, 8.2 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 20°C에서 16시간 동안 교반하였다. HPLC 및 LCMS 분석에 의하면, 트랜스 생성물 및 시스 생성물 (M+H 698; 1:1 비율)로 완전히 전환되었음을 나타내었다. 반응물을 물로 켄칭하여, 농축시키고, 20% KHCO₃와 함께 교반하여, 아세트산에틸로 추출하고, 건조시켜 (Na₂SO₄), 여과하고, 중발시켜, 2.8 g을 얻었다. 이성질체 생성물을 위터스 (Waters) 인스트루먼트 (instrument) 및 30 mm×100 mm 엑스브리지 (Xbridge) C18 컬럼; 60 mL/min; 55% CH₃CN-H₂O (0.1% NH₄OH); 0.5 min; 72%로 4.5 그래디언트; 24 런; 체류시간 트랜스 이성질체, 4.6 min; 시스 이성질체, 5.4 min를 사용하여 prep LCMS로 분리하였다. 분리된 시스 이성질체는 <1% 잔류 트랜스 이성질체를 함유하였다. 1.00 g 시스 이성질체, 37% 수율을 얻었다. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; 또한 COSY, HSQC 및 HMBC): δ 8.83 (s, 1H); 8.40 (s, 1H); 8.28 (s, 1H); 7.40 (m, 1H); 6.80 (m, 1H); 6.67 (s, 1H); 5.64 (s, 2H, SEM); 5.17 (m, 1H, OCH); 4.01 (t, 2H, OCH₂); 3.74 (s, 2H, NCH); 3.59 (m, 2H, NCH); 3.55 (t, 2H, SEM); 3.38 (s, 2H, CH₂CN); 2.95 (t, 2H, CH₂); 2.30 (m, 1H, NCH); 2.15 (m, 2H); 1.84 (m, 2H); 1.50 (m, 2H); 1.30 (m, 2H); 0.90 (t, 2H, SEM); -0.92 (s, 9H, SEM).

[0252] 단계 6: {1-(시스-4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트리스(트라이플루오로아세테이트)

{1-(4-{[6-(2-하이드록시에틸)-2-(트라이플루오로메틸)파리미딘-4-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 이성질체를 염화메틸렌 (18 mL) 및 트라이플루오로아세트산 (TFA, 18 mL, 230 mmol)에 용해시켜, 1.0시간 동안 교반하였

다. 용액을 농축시켜, TFA를 제거하였다. LCMS에 의하면, 하이드록시메틸 중간체, M+H 598, 약간의 이의 TFA 에스테르, M+H 694, 및 <5% 잔류 SEM으로의 전환을 나타내었다. 잔류물을 메탄올 (36 mL)에 용해시켜, 수중의 15.0 M 수산화암모늄 (9.0 mL, 130 mmol)을 첨가하였다. 용액을 21°C에서 18시간 동안 교반하였다. HPLC 및 LCMS에 의하면, 잔류 M+H 598 피크 또는 TFA 에스테르가 없음을 나타내었다. 용액을 증발시켰다. 중탄산염 수용액을 첨가하고, 생성물을 EtOAc로 추출하여, 암모늄 트라이플루오로아세테이트를 제거하였다. 합한 EtOAc 추출물을 증발시켜, 0.96 g을 얻었다. 이것을 1.5 당량의 TFA (180 μL)를 함유하는 10% H₂O/ACN 70 mL에 용해시켰다. 생성물을 워터스 프랙션-린스 (Waters Fraction-Linx) 인스트루먼트 및 30 mm × 100 mm 선파이어 (Sunfire) C18 컬럼; 60 mL/min; 15% ACN-H₂O (0.1%TFA), 0.5 min; 33%의 그레이언트, 4.5 min; m/z 568로 세팅된 검출기; 14 렌; 체류시간 5.0 min을 사용하여 prep LCMS로 분리하였다. HPLC는 UV_{max} 224, 252, 294 및 318 nm를 나타내었다. 합한 분획을 동결건조시켰다. 1.0 g 백색 고체 (80% 수율)를 얻었다. NMR에 의하면, 이는 2.5 TFA 염인 것으로 나타났다. ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN; 또한 COSY, HSQC 및 HMBC): δ 10.84 (s, 1H, NH); 9.00 (s, 1H); 8.90 (s, 1H); 8.56 (s, 1H); 7.66 (m, 1H); 7.10 (m, 1H); 6.86 (s, 1H); 5.39 (m, 1H, OCH); 4.86 (brs, 2H, NCH); 4.66 (m, 2H, NCH); 3.90 (t, 2H, OCH₂); 3.78 (s, 2H, CH₂CN); 3.39 (m, 1H, NCH); 2.92 (t, 2H, CH₂); 2.20 (m, 2H); 1.92 (m, 2H); 1.76 (m, 4H). ¹⁹F NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ - 69.8 (s); - 74.8 (s, TFA); C₂₇H₂₉F₃N₉O₂의 LCMS 계산치 (M+H)⁺: m/z = 568.24

[0254] 실시예 17: {1-(시스-4-{[4-[(에틸아미노)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 트리스(트라이플루오로아세테이트)



[0255] 단계 1: [2-[(시스-4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}사이클로헥실)옥시]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-4-일]메틸 메탄설포네이트

[0256] 단계 1: [2-[(시스-4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}사이클로헥실)옥시]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-4-일]메틸 메탄설포네이트

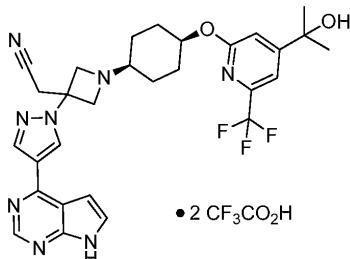
[0257] {1-(시스-4-{[4-(하이드록시메틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 (US 2013/0045963의 실시예 64, 145.0 mg, 0.2124 mmol)을 염화메틸렌 (2.93 mL)에 용해시켜, 0°C로 냉각시켰다. 이것에 N,N-다이아이소프로필아민 (60.5 μL, 0.347 mmol), 이어서 염화메탄설포닐 (23 μL, 0.30 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 EtOAc로 워크업하여, 다음 반응에서 사용하였다. MS(ES):761(M+1).

[0258] 단계 2: {1-(시스-4-{[4-[(에틸아미노)메틸]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}사이클로헥실)옥시]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-4-일]메틸 메탄설포네이트

[0259] [2-[(시스-4-{3-(시아노메틸)-3-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-1-일}사이클로헥실)옥시]-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-4-일]메틸 메탄설포네이트 (50 mg, 0.06571 mmol)를 1,4-다이옥산 (2.5 mL)에 용해시켜, THF 중의 2.0 M 에틸아민 (300 μL, 0.6 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 25°C에서 16시간 동안 교반하고, 이때 LCMS 분석에 의하면, 주로 생성물인 것으로 나타났다. 생성물을 US 2013/0045963의 실시예 1에서와 같이 LC로 정제하고, 증발시켜, 탈보호하고, LC로 정제하여, 생성물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 9.08 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.08 (d, 2H), 4.80 (d, 2H), 4.27 (s,

2H), 3.74 (s, 2H), 3.50 (m, 1H), 3.16 (q, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 1.76 (m, 4H), 1.34 (t, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, CD₃OD) δ -70.52 (s), -77.49 (s). MS(ES):580(M+1).

[0260] 실시예 18: {1-(시스-4-{[4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파리를로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 비스(트라이플루오로아세테이트)



[0261]

[0262] 단계 1: 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)아이소니코틴산

[0263] 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)페리딘 (1.0 g, 5.51 mmol, 오크우드 제품)을 테트라하이드로푸란 (20 mL)에 용해시키고, THF 중의 1.0 M 염화리튬 - 클로로(2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-일)마그네슘 (1:1) (6.610 mL, 6.610 mmol, 알드리치 컴퍼니)을 25°C에서 첨가하였다. 반응물을 25°C에서 1시간 동안 교반하여,

[0264] -78°C로 냉각시켰다. 반응물을 -78°C에서 1시간 동안 교반하여, 실온으로 가온시키고, 물로 켄칭하여, 1N NaOH 와 에테르에 분배하였다. 상을 분리하여, 수상을 추가의 에테르로 세정하고, 진한 HCl로 pH~1로 산성화시켜, 에테르로 추출하였다. 합한 유기상을 물, 포화 NaCl로 세정하고, MgSO₄로 건조시켜, 여과하고, 증발 건조시켜, 조생성물을 얻었다. NMR 분석에 의하면, 조생성물이 파라 카르복실산과 메타 카르복실산의 ~2:1 혼합물로 구성되는 것으로 나타났다. 혼합물을 다음 반응으로 옮겨갔다. 440 MHz NMR(CDCl₃) δ 8.17 (s, 1H), 8.11 (s, 1H).

[0265] 단계 2: 에틸 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)아이소니코티네이트 및 에틸 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)니코티네이트

[0266] 바이알에서 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)니코틴산 (0.98 g, 4.4 mmol) 및 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)아이소니코틴산 (1.85 g, 8.2 mmol)을 오르토포름산에틸 (5.0 mL, 30.1 mmol)에 용해시켜, 5시간 동안 120°C로 가열하고, 이때 TLC 분석에 의하면, 대부분의 출발 물질이 소비되어 생성물이 생성된 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 진공 중에서 증발시켜, 잔류물을 10% EtOAc/헥산을 사용하여 실리카 젤 크로마토그래피로 정제하여, 2개의 에틸 에스테르 생성물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 4.47 (q, 2H), 1.44 (t, 3H).

[0267] 단계 3: 2-[2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-4-일]프로판-2-올

[0268] 에틸 2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)아이소니코티네이트 (0.35 g, 1.4 mmol)를 테트라하이드로푸란 (13.8 mL)에 용해시켜, -78°C로 냉각시킨 다음에, 에테르 중의 3.0 M 메틸마그네슘 브로마이드 (1.4 mL, 4.1 mmol)를 첨가하였다. 반응물을 -78°C에서 3시간 동안 교반하고, 이때 LCMS 분석에 의하면, 출발 물질이 존재하지 않음을 나타내었다. 반응물을 포화 NH₄Cl로 켄칭하여, 물/1 N HCl과 EtOAc에 분배하고, 상을 분리하여, 수상을 추가의 EtOAc로 세정하였다. 합한 유기상을 물, 포화 NaCl로 세정하고, MgSO₄로 건조시켜, 여과하고, 증발 건조시켜, 조생성물을 얻었다. NMR 분석에 의하면, 조생성물이 알코올과 메틸 케톤 중간체의 ~1:1 혼합물로 구성되는 것으로 나타났다. 조물질을 정제없이 다음 반응에 사용하였다. NMR 400 MHz NMR(CDCl₃): δ 7.70 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 1.60 (s, 6H)

[0269] 단계 4: 2-[2-(1,4-다이옥사스피로[4.5]데칸-8-일옥시)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-4-일]프로판-2-올

[0270] 1,4-다이옥사스피로[4.5]데칸-8-올 (0.25 g, 1.58 mmol)과 2-[2-클로로-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-4-일]프로판-2-올 (0.2 g, 0.835 mmol)을 테트라하이드로푸란 (2 mL)에 용해시켜, 0°C로 냉각시키고, 광유 중의 수소화나트륨 (70.0 mg, 1.75 mmol)의 60% 혼합물을 첨가하여, 반응물을 0°C에서 30분간, 25°C에서 60시간 교반하고,

이때 TLC 분석에 의하면, 약간의 생성물의 존재를 나타내었다. 반응물을 물로 켄칭하고, 아세트산에틸로 추출하여, 유기 추출물을 물, 포화 NaCl로 세정하고, 건조시켜 ($MgSO_4$), 진공 중에서 증발시켰다. 잔류물을 LC (pH 2)로 정제하여, 생성물을 얻었다. MS(ES):362 (M+1).

[0271] 단계 5: 4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥사논

[0272] 2-[2-(1,4-다이옥사스파로[4.5]데스-8-일옥시)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-4-일]프로판-2-올 (0.049 g, 0.14 mmol)을 아세톤 (3.7 mL)에 용해시켰다. 수중의 12.0 M 염화수소 용액 (0.43 mL, 5.2 mmol)을 첨가하여, 25°C에서 16시간 동안 교반하고, 이때 LCMS에 의하면, 약 70% 반응이 완료되었음을 나타내었다. 추가의 수중의 12.0 M 염화수소 (0.43 mL, 5.2 mmol)를 첨가하여, 3시간 동안 교반하고; LCMS에 의하면, ~90% 반응이 완료되었음을 나타내며, 과잉량의 $NaHCO_3$ 로 켄칭하여, EtOAc로 추출하고, 유기 추출물을 증발시켜, 생성물을 얻었다. 이것을 정제없이 다음 반응에 사용하였다. MS(ES):318 (M+1).

[0273] 단계 5: {1-(시스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{{2-(트라이메틸실릴)에톡시}메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴

[0274] {3-[4-(7-{{2-(트라이메틸실릴)에톡시}메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 다이하이드로클로라이드 (55.3 mg, 0.115 mmol) 및 4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥사논을 건조 1,2-다이클로로에탄 (1.38 mL)에 용해시켜, 5분간 교반하고, 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드 (86.1 mg, 0.406 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하고, 이때 LCMS 분석에 의하면, 주로 2개의 부분 입체 이성질체 생성물을 나타내었다. 반응물을 물로 켄칭하여, $NaHCO_3$ 로 중화하고, 아세트산에틸로 추출하여, 용매를 증발시켰다. 잔류물을 LCMS (pH 10)로 정제하고, 제2 피크를 포함하는 분획을 합해, 증발시켜, {1-(시스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{{2-(트라이메틸실릴)에톡시}메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴을 얻었다. 제1 피크도 분리하여, {1-(트랜스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{{2-(트라이메틸실릴)에톡시}메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴을 얻었다. MS(ES): 712(M+1).

[0275] 단계 6: {1-(시스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 비스(트라이플루오로아세테이트)

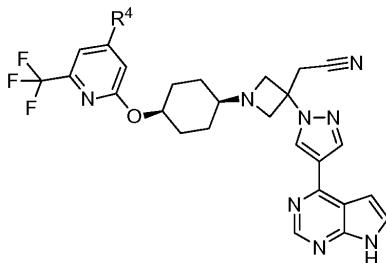
[0276] {1-(시스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7-{{2-(트라이메틸실릴)에톡시}메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴을 US 2013/0045963의 실시예 1에 기재된 바와 같이 탈보호하고, 액체 크로마토그래피 (pH 2)로 정제하여, 1-(시스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 비스(트라이플루오로아세테이트)를 얻었다.

유사한

방법으로

{1-(트랜스-4-{{4-(1-하이드록시-1-메틸에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}사이클로헥실)-3-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]아제티딘-3-일}아세토니트릴 비스(트라이플루오로아세테이트)를 제조하여, 특성 평가하였다. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 9.07 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.78 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.24 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.09 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 4.82 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.27 (m, 2H), 2.0 (m, 2H), 1.74 (m, 4H), 1.50 (s, 6H). MS(ES): 581(M+1).

[0277] 하기 실시예 19 및 20을 실시예 17의 절차와 유사하게 제조하였다.

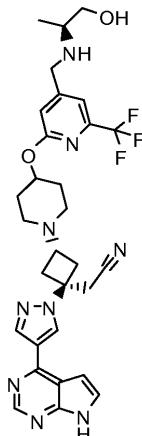


[0278]

실시예 번호	R4	MS (M+H) ⁺	화합물명
19		622	{1-(시)스-4-{{[4-{{[(3R)-3-하이드록시-1-메틸프로필]아미노}]-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}사이클로헥실}-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일]아세토니트릴 펜타키스(트라이플루오로아세테이트)
20		622	{1-(시)스-4-{{[4-{{[(3S)-3-하이드록시-1-메틸프로필]아미노}]-1-일]메틸}-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}사이클로헥실}-3-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]아제티딘-3-일]아세토니트릴 트리스(트라이플루오로아세테이트)

[0279]

[0280] 실시예 21. {트랜스-3-(4-([4-([(1S)-2-하이드록시-1-메틸에틸]아미노]메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-피롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-피라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴



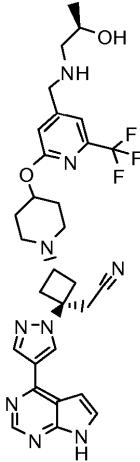
[0281]

[0282] N,N-다이아이소프로필에틸아민 (9.4 μ L, 0.054 mmol) 및 메탄설폰산 무수물 (7.9 mg, 0.045 mmol)을 염화메틸렌 (0.30 mL) 중의 {트랜스-3-(4-{[4-(하이드록시메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴 (10.0 mg, 0.018 mmol, US 2014/0005166의 실시예 A2, 단계 F의 중간체의 피크 1)의 용액에 첨가하고, 메실레이트 생성물을 30분간 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 잔류물을 테트라하이드로푸란 (0.30 mL)과 메탄올 (0.10 mL)의 혼합물을 다시 용해시키고, (2S)-2-아미노프로판-1-올 (20. μ L, 0.27 mmol, 아크로스 (Acros))을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 조생성물을 1:1 TFA:DCM과 함께 1시간 동안 교반하여 탈보호한 다음에, 농축시키고, LCMS로 측정되는 것으로 탈보호가 완료될 때까지 메탄올 (1.0 mL) 중의 에틸렌다이아민 (0.10 mL)과 함께 교반하였다. 생성물을 분취용 HPLC-MS (0.15% NH₄OH를 함유하는 MeCN/H₂O의 그래디언트로 용리되는 C18)를 사용하여 정제하였다. 용리액을 냉동시키고 동결 건조시켜, 유리 염기 (6.0 mg, 54%)로서의 생성물을 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.74 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.51 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 5.23 – 5.00 (m, 1H), 3.90 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 3.81 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 3.50 (dd, J = 10.9, 4.9 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 10.9, 6.9 Hz, 1H), 3.31 (s, 2H), 3.16 – 3.05 (m, 2H), 2.95 (p, J = 7.5 Hz, 1H), 2.83 – 2.63

(m, 3H), 2.56 – 2.42 (m, 2H), 2.39 – 2.23 (m, 2H), 2.19 – 2.04 (m, 2H), 1.93 – 1.75 (m, 2H), 1.05 (d, J = 6.4 Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, CD₃OD) δ -70.30 (s). LCMS (M+H)⁺: 610.3

[0283]

실시예 22. {트랜스-3-(4-{[4-({[(2R)-2-하이드록시프로필]아미노}메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴



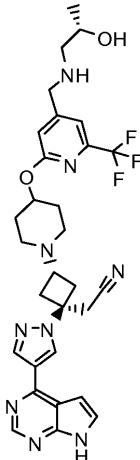
[0284]

[0285]

치환 단계에서 (2R)-1-아미노프로판-2-올 (12 μL , 0.15 mmol, 알드리치)을 사용하여, US 2014/0005166의 실시 예 9의 절차를 50 °C에서 2시간 동안 행하였다. 생성물을 유리 염기 (8.7 mg, 46%)로서 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 12.13 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.11 – 4.90 (m, 1H), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.67 (tt, J = 10.3, 5.6 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.11 – 2.96 (m, 2H), 2.81 (p, J = 7.5 Hz, 1H), 2.74 – 2.56 (m, 2H), 2.46 – 2.25 (m, 4H), 2.24 – 2.09 (m, 2H), 2.09 – 1.90 (m, 2H), 1.81 – 1.51 (m, 2H), 1.03 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{19}F NMR (376 MHz, d₆-DMSO) δ -67.29 (s). LCMS (M+H)⁺: 610.3.

[0286]

실시예 23. {트랜스-3-(4-{[4-({[(2S)-2-하이드록시프로필]아미노}메틸)-6-(트라이플루오로메틸)페리딘-2-일]옥시}페페리딘-1-일)-1-[4-(7H-페롤로[2,3-d]페리미딘-4-일)-1H-페라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴



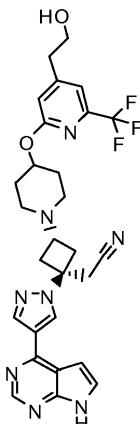
[0287]

[0288]

치환 단계에서 (2S)-1-아미노프로판-2-올 (12 μL , 0.15 mmol, 알드리치)을 사용하여, US 2014/0005166의 실시 예 9의 절차를 50 °C에서 2시간 동안 행하였다 (7.9 mg, 42%). ^1H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 12.13 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.27 – 4.71 (m, 1H), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.72 – 3.62 (m, 1H), 3.42 (s, 2H), 3.09 – 2.96 (m, 2H), 2.81 (p, J = 7.4 Hz, 1H), 2.72 – 2.55 (m, 2H), 2.43 – 2.25 (m, 4H), 2.25 – 2.08 (m, 2H), 2.08 – 1.96 (m, 2H), 1.78 – 1.57 (m, 2H), 1.03 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{19}F

NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) δ -67.29 (s). LCMS ($M+H$)⁺: 610.3.

[0289] 실시예 24. {트랜스-3-(4-{[4-(2-하이드록시에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴



[0290]

[0291] {트랜스-3-(4-{[4-(2-하이드록시에틸)-6-(트라이플루오로메틸)파리딘-2-일]옥시}파페리딘-1-일)-1-[4-(7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-파롤로[2,3-d]파리미딘-4-일)-1H-파라졸-1-일]사이클로부틸}아세토니트릴 (9.0 mg, 0.013 mmol, US 2014/0005166의 실시예 A4, 단계 3의 중간체의 피크 2)을 탈보호하고, 염화메틸렌 (0.50 mL)과 트라이플루오로아세트산 (0.50 mL)의 혼합물에서 1시간 동안 교반하여 정제하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 잔류물을 에틸렌다이아민 (0.1 mL)을 함유하는 메탄올 (0.1 mL) 중에서 교반하였다. 분취용 HPLC-MS (0.15% NH₄OH를 함유하는 MeCN/H₂O의 그래디언트로 용리되는 C18)로 정제하여, 유리 염기 (5.8 mg, 79%)로서의 생성물을 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, d_6 -DMSO) δ 12.12 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.60 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.08 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 4.99 (tt, J = 8.2, 4.1 Hz, 1H), 4.73 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.66 (q, J = 5.9 Hz, 2H), 3.42 (s, 2H), 3.11 – 2.95 (m, 2H), 2.90 – 2.71 (m, 3H), 2.71 – 2.56 (m, 2H), 2.44 – 2.30 (m, 2H), 2.15 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 2.09 – 1.82 (m, 2H), 1.83 – 1.58 (m, 2H). ¹⁹F NMR (282 MHz, d_6 -DMSO) δ -67.26 (s). LCMS ($M+H$)⁺: 567.2.

실시예 A: 인비트로 (*in vitro*) JAK 키나제 분석

[0292]

[0293] 본원의 화합물에 대하여, 문헌 [Park *et al.*, *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104]에 기재된 하기 인비트로 분석에 따라 JAK 표적의 억제 활성을 테스트하였다. N-말단 His tag를 포함하는 인간 JAK1 (a.a. 837-1142), JAK2 (a.a. 828-1132) 및 JAK3 (a.a. 781-1124)의 촉매 도메인을 곤충 세포의 바콜로바이러스를 사용하여 발현시켜, 정제하였다. JAK1, JAK2 또는 JAK3의 촉매 활성을 비오틴화 (biotinylated) 웨티드의 인산화를 측정하여 분석하였다. 인산화 웨티드를 균일 시간 분해 형광 (*homogenous time resolved fluorescence*; HTRF)에 의해 검출하였다. 화합물의 IC₅₀을 100 mM NaCl, 5 mM DTT 및 0.1 mg/mL (0.01%) BSA를 함유하는 50 mM 트리스 (Tris) (pH 7.8) 완충액 중에 효소, ATP 및 500 nM 웨티드를 함유하는 40 μ L 반응물에서 각 키나제에 대하여 측정하였다. 1 mM IC₅₀ 측정의 경우, 반응물의 ATP 농도는 1 mM이었다. 반응을 실온에서 1시간 동안 행한 다음에, 반응을 분석 완충액 (미국 매사추세츠주 보스턴에 소재하는 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer)) 중의 20 μ L 45 mM EDTA, 300 nM SA-APC, 6 nM Eu-Py20으로 중지하였다. 유로퓸 표지 항체로의 결합을 40분간 행하여, HTRF 시그널을 퓨전 플레이트 리더 (Fusion plate reader; 미국 매사추세츠주 보스턴에 소재하는 퍼킨 엘머) 상에서 측정하였다. 1 mM ATP에서 실시예 A의 분석에 의해 테스트된 실시예의 화합물에 대한 데이터에 관해서는 표 2를 참조한다.

실시예 B: 세포 분석

[0294]

[0295] 사이토카인 의존성, 따라서 JAK/STAT 시그널 전달 의존성 암세포주는 성장을 위해, RPMI 1640, 10% FBS 및 적절한 사이토카인 1 nG/mL 중에서 웨일 6000개의 세포로 플레이팅될 수 있다 (96 웨일 플레이트 포맷). 화합물을 DMSO/배지 (최종 농도 0.2% DMSO) 중의 세포에 첨가하여, 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 세

포 생존율에 대한 화합물의 효과를 셀타이터-글로 루미네스턴트 셀 바이어빌리티 어세이 (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay; 프로메가 (Promega)), 이어서 탑카운트 (TopCount (미국 매사추세츠주 보스턴에 소재하는 퍼킨 엘머)) 정량법을 이용하여 평가하였다. 화합물의 잠재적인 벗어난 효과를 동일한 분석 리드아웃 (readout)과 함께 비JAK에 의한 (non-JAK driven) 세포주를 사용하여 동시에 측정하였다. 모든 실험을 통상적으로 중복하여 행하였다.

[0296] 상기 세포주는 JAK 키나제 또는 잠재적인 다운스트림 기질, 예컨대 STAT 단백질, Akt, Shp2 또는 Erk의 인산화에 대한 화합물의 효과를 조사하는 데에도 사용될 수 있다. 이러한 실험은 하룻밤 동안의 사이토카인 기아 (cytokine starvation), 이어서 화합물을 사용한 단시간의 전배양 (preincubation; 2시간 이하) 및 약 1시간 이하의 사이토카인 자극 후에 행해질 수 있다. 그 다음에, 단백질을 세포로부터 추출하여, 인산화 단백질과 총 단백질을 구별할 수 있는 항체를 사용하여 웨스턴 블로트 또는 ELISA를 비롯한 당업계의 교육을 받은 당업자에게 잘 알려진 기술에 의해 분석하였다. 이러한 실험은 정상 세포 또는 암세포를 이용하여, 종양 세포 생존 생태 또는 염증성 질환의 매개체 (mediator)에 대한 화합물의 활성을 조사할 수 있다. 예를 들어, 후자에 관해서는, 사이토카인, 예컨대 IL-6, IL-12, IL-23 또는 IFN을 사용하여, JAK 활성화를 촉진함으로써, STAT 단백질(들)의 인산화와, 잠재적으로 전사 프로파일 (어레이 또는 qPCR 기술에 의해 평가됨) 또는 단백질, 예컨대 IL-17의 생성 및/또는 분비를 초래할 수 있다. 이러한 사이토카인 매개 작용을 억제하는 화합물의 능력은 당업계의 교육을 받은 당업자에게 일반적인 기술을 이용하여 측정될 수 있다.

[0297] 본원의 화합물은 또한 돌연변이형 JAK, 예를 들어 골수 증식성 질환에서 발견되는 JAK2V617F 돌연변이체에 대한 이의 효능 및 활성을 평가하도록 설계된 세포 모델에서 테스트될 수 있다. 이러한 실험은 종종, 암생형 또는 돌연변이형 JAK 키나제가 이소적으로 (ectopically) 발현되는 혈액 계통의 사이토카인 의존성 세포 (예를 들어, BaF/3)를 이용한다 (James, C., et al. *Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC* 280:41893-41899). 엔드포인트는 세포 생존, 증식 및 인산화 JAK, STAT, Akt 또는 Erk 단백질에 대한 화합물의 효과를 포함한다.

[0298] 본원의 특정 화합물은 T 세포 증식을 억제하는 이의 활성을 대하여 평가될 수 있다. 예를 들면, 분석은 제2 사이토카인 (즉, JAK)에 의한 증식 분석으로 간주될 수 있으며, 면역 억제 또는 면역 활성화의 억제에 대한 단순화한 분석 (simplistic assay)으로도 간주될 수 있다. 다음은 이러한 실험이 어떻게 행해질 수 있는지에 대한 간단한 개요이다. 말초혈액 단핵세포 (PBMC)를 피콜-하이파크 (Ficoll Hypaque) 분리 방법을 이용하여, 인간 전혈 시료로부터 준비하고, T 세포 (분획 2000)를 일루트리에이션 (elutriation)에 의해 PBMC로부터 얻을 수 있다. 새로 단리된 인간 T 세포를 37°C에서 최대 2일까지 2×10^6 세포/ml의 밀도로 배지 (10% 소태아 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640)에 유지할 수 있다. IL-2 자극 세포 증식 분석을 위해, T 세포를 먼저 10 μ g/mL의 최종 농도로 72시간 동안 피토헤마글루티닌 (PHA)으로 처리하였다. PBS로 1회 세정한 후에, 6000개의 세포/웰을 96-웰 플레이트에 플레이팅하여, 100 U/mL 인간 IL-2 (이스라엘 레호보트에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 (ProSpec-Tany TechnoGene))의 존재 하에 배지에서 상이한 농도의 화합물로 처리하였다. 플레이트를 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하고, 증식 지수를 제조소가 제안한 프로토콜 (미국 위스콘신주 매디슨에 소재하는 프로메가)에 따라 셀타이터-글로 루미네스턴트 시약을 사용하여 평가하였다.

분석 C. S100A9 트랜스제닉 마우스 모델

[0300] *S100A9* 트랜스제닉 마우스가 MDS와 유사한 진행성 다계열 혈구감소증 및 세포학적 형성이상의 발생을 동반하는 MDSC의 골수 축적을 나타내는 것으로 이전에 입증되었다. 게다가, 올트랜스 레티노산 처리 또는 CD33 시그널링의 활성 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 함유 (ITAM 함유) 어댑터 단백질 (DAP12) 중단에 의한 MDSC의 조기 강제 성숙에 의해, 혈액 표현형 (hematologic phenotype)을 구출하여, 질환을 경감시켰다. 이러한 시스템은 전임상 모델에서의 MDS 유사 질환에 대한 JAK1 억제 효과를 테스트하는데 유용할 수 있다 (*J. Clin. Invest.*, 123(11):4595-4611 (2013)). 따라서, JAK1 선택적 억제제를 경구 섭식 (oral gavage)으로 투여하였다. *S100A9* 트랜스제닉 마우스에서 관찰되는 혈구감소증 및 세포학적 형성이상을 감소시키는 화합물의 능력을 모니터링하였다.

[0301] 모든 특허, 특히 출원서, 논문 및 서적은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.