

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045143**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

(51) Int. Cl. **C07D 401/14** (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202291483

(22) Дата подачи заявки
2014.03.05

(54) **СПОСОБЫ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ИНГИБИТОРА
JAK**

(31) **61/773,659**

(56) **WO-A1-2012177606**
WO-A1-2011130146

(32) **2013.03.06**

(33) **US**

(43) **2022.08.31**

(62) **201891157; 2014.03.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСАЙТ ХОЛДИНГС
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Лю Пинли, Ван Дэнцинь, У Юнчжун,
Цао Ганьфэн, Ксиа Майкл (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам и промежуточным соединениям для изготовления {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил]пиперидин-4-ил}-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]азетидин-3-ил}ацетонитрила, полезного при лечении заболеваний, связанных с активностью киназы Януса (JAK), включая воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, рак и других заболеваний.

045143

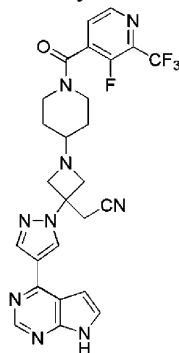
B1

045143
B1

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 61/773659, поданной 6 марта 2013 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Область техники

Данное изобретение относится к способам получения соединения формулы I:



I

которое является полезным при лечении заболеваний, связанных с активностью Янус-киназы (JAK), включая воспалительные заболевания, аутоиммунные заболевания, рак и другие заболевания.

Уровень техники

Протеинкиназы (ПК) регулируют различные биологические процессы, в том числе, среди прочего, рост, выживание и дифференциацию клеток, формирование органов, морфогенез, неоваскуляризацию, репарацию и регенерацию ткани. Кроме того, протеинкиназы играют особую роль в огромном количестве заболеваний человека, включая рак. Цитокины, низкомолекулярные полипептиды или гликопротеины, регулируют множество путей, вовлеченных в воспалительную реакцию хозяина на сепсис. Цитокины влияют на дифференциацию, пролиферацию и активацию клеток, и могут модулировать провоспалительные и противовоспалительные реакции, что позволяет реципиенту надлежащим образом реагировать на патогенные факторы. Проведение сигнала широкого спектра цитокинов включает семейство Янус-киназы (JAK) протеин-тирозинкиназ, а также сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (STAT). Существуют четыре известных JAK млекопитающих: JAK1 (Янус-киназа-1), JAK2, JAK3 (также известная как Янус-киназа, лейкоцитарная; JAKL и L-JAK) и TYK2 (протеин-тирозинкиназа 2).

Стимулированные цитокином иммунные и воспалительные ответы способствуют патогенезу заболеваний: патологиям, таким как тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), которые являются результатом подавления иммунной системы, в то время как гиперактивная или неадекватная иммунная/воспалительная реакция способствует патологии аутоиммунных заболеваний (например, астма, системная красная волчанка, тиреоидит, миокардит), и болезням, таким как склеродерма и остеоартрит (Ortmann, R. A., T. Cheng, et al., (2000) Артрит Res 2(1): 16-32).

Недостаточная экспрессия JAK ассоциируется со многими патологическими состояниями. Например, мыши Jak1^{-/-} рождаются карликовыми, не в состоянии сосать и гибнут в перинатальном периоде (Rodig, S. J., M. A. Meraz, et al., (1998) Cell 93(3): 373-83). Эмбрионы мышей Jak2^{-/-} анемичны и гибнут в районе 12,5 дней после коитуса из-за отсутствия развитого эритропоэза.

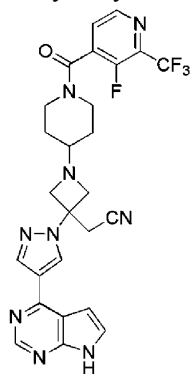
Метаболический путь JAK/STAT, и, в частности, все четыре JAKs, как полагают, играют определенную роль в патогенезе астматической реакции, хронической обструктивной болезни легких, бронхита и других связанных с воспалительными заболеваниями нижних дыхательных путей. Множество цитокинов, которые проводят сигнал через JAK, связаны с воспалительными заболеваниями/состояниями верхних отделов дыхательных путей, например, поражающими нос и придаточные пазухи носа (например, ринит и синусит), независимо от того, являются они классическими аллергическими реакциями или нет. Метаболический путь JAK/STAT также вовлечен в воспалительные заболевания/состояния глаза и хронические аллергические реакции.

Активация JAK/STAT в раковых заболеваниях может происходить путем стимуляции цитокинов (например, IL-6 или GM-CSF) или путем снижения эндогенных супрессоров JAK сигнализации, например SOCS (супрессорной или цитокиновой сигнализации) или PIAS (белковый ингибитор активированного STAT) (Boudny, V., and Kovarik, J., Neoplasms. 49:349-355, 2002). Активация сигнализации STAT, а также других метаболических путей ниже JAKs (например, Akt), коррелировала с неблагоприятным прогнозом при многих типах рака (Bowman, T., et al. Oncogene 19:2474-2488, 2000). Повышенные уровни цитокинов в кровотоке, которые проводят сигнал через JAK/STAT, играют определяющую роль в кахексии и/или хронической усталости. Как таковое, ингибирование JAK может быть благоприятным для раковых пациентов по причине дополнительного усиления потенциальной противоопухолевой активности.

JAK2 тирозинкиназа может быть полезной для пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, например, истинной полицитемией (ИП), идиопатической тромбоцитемией (ИТ), миелоидной метаплазией с миелофиброзом МММ (Levin, et al., Cancer Cell, vol. 7, 2005: 387-397). Ингибирование киназы

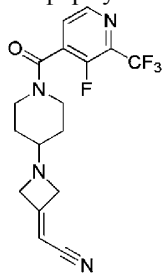
045143

Настоящее изобретение относится к способу получения соединения формулы I:



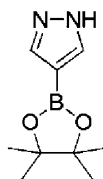
I

включающему взаимодействие соединения формулы VIII:



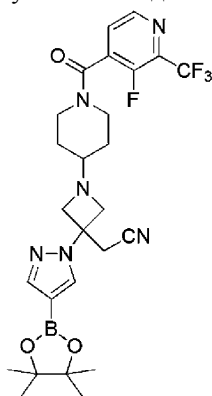
VIII

с соединением формулы IXa:



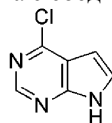
IXa

в присутствии агента связывания с получением соединения формулы VIIa:



VIIa

и взаимодействие соединения формулы VIIa с соединением формулы IVa:



IVa

в условиях реакции сочетания Сузуки с получением соединения формулы I, где условия реакции сочетания Сузуки включают нагревание реакционной смеси, содержащей соединение формулы VIIa, соединение формулы IVa, катализатора реакции сочетания Сузуки, основание и второй компонент растворителя.

Подробное описание сущности изобретения

Способы, описанные в данном документе, могут быть проверены в соответствии с любым подходящим методом, известным в данной области техники. Например, образование продукта можно контролировать с помощью спектроскопических методов, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, или спектрофотометрия (например, УФ-видимая); или с помощью хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография (ТСХ) или других связанных с ними методов.

Как используют в данном документе термин "приведение в контакт" используют так, как известно в данной области техники и обычно он относится к приведению в контакт реагентов таким образом, чтобы сделать возможным их взаимодействие на молекулярном уровне для достижения химического или физического превращения. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт включает два реагента, причем один или более эквивалентов второго реагента используют по отношению к первому реагенту. Этапы приведения в контакт способов, описанных в данном документе, могут быть проведены в течение времени и в условиях, подходящих для получения идентифицированного продукта.

Получение соединений может включать защиту и удаление защиты различных химических групп. Необходимость защиты и снятия защиты, и выбора соответствующих защитных групп может быть легко определена специалистом в данной области техники. Химию защитных групп можно найти, например, Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Подбор защитных групп и способов их образования и расщепления, описанных в данном документе, могут быть скорректированы по мере необходимости с учетом различных заместителей.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители могут быть существенно нереакционноспособными с исходными веществами (реагентами), промежуточными продуктами при температурах, при которых проходит реакция, например, температуры которые могут варьироваться от температуры заморозки растворителя до температуры кипения растворителя. Любая выбранная реакция может быть осуществлена в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции, могут быть выбраны подходящие растворители для конкретной стадии реакции. В некоторых вариантах осуществления реакции можно проводить в отсутствие растворителя, например, когда по крайней мере один из реагентов является жидкостью или газом.

Подходящие растворители могут включать галогенированные растворители, такие как четыреххлористый углерод, бромдихлорметан, дибромхлорметан, бромформ, хлороформ, бромхлорметан, дибромметан, бутил хлорид, дихлорметан, тетрахлорэтилен, трихлорэтилен, 1,1,1-трихлорэтан, 1,1,2-трихлорэтан, 1,1-дихлорэтан, 2-хлорпропан, α,α,α -трифтортолуол, 1,2-дихлорэтан, 1,2-дибромэтана, гексафторбензол, 1,2,4-трихлорбензол, 1,2-дихлорбензол, хлорбензол, фторбензол, их смеси и тому подобное.

Подходящие эфирные растворители включают: диметоксиметан, тетрагидрофуран, 1,3-диоксан, 1,4-диоксан, фуран, диэтиловый эфир, диметиловый эфир этиленгликоля, диэтиловый эфир этиленгликоля, диметиловый эфир триэтиленгликоля, анизол, трет-бутилметилэтиловый эфир, их смеси и т.п.

Подходящие протонные растворители могут включать, в качестве примера и без ограничения, воду, метанол, этанол, 2-нитроэтанол, 2-фторэтанол, 2,2,2-трифторэтанол, этиленгликоль, 1-пропанол, 2-пропанол, 2-метоксиэтанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изобутиловый спирт, трет-бутиловый спирт, 2-этоксиэтанол, диэтиленгликоль, 1-, 2-, 3- или пентанол, неопентиловый спирт, трет-пентиловый спирт, диэтиленгликоль монометилэтиловый эфир, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, циклогексанол, бензиловый спирт, фенол или глицерин.

Подходящие апротонные растворители могут включать, в качестве примера и без ограничения, тетрагидрофуран (ТГФ), N,N-диметилформамид (ДМФА), N,N-диметилацетамид (ДМА), 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2(1H)-пиримидинон (DMPU), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (ДМИ), N-метилпирролидинон (NMP), формамид, N-метилацетамид, N-метилформамид, ацетонитрил, диметилсульфоксид, пропионитрил, этилформиат, метилацетат, гексахлорацетон, ацетон, этилметилкетон, этилацетат, сульфолан, N,N-диметилпропионамид, тетраметилмочевину, нитрометан, нитробензол или гексаметилфосфорамид.

Подходящие углеводородные растворители включают бензол, циклогексан, пентан, гексан, толуол, циклогептан, метилциклогексан, гептан, этилбензол, m-, o- или p-ксилол, октан, индан, нонан, или нафталин.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены при соответствующих температурах, которые могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Температура реакции будет зависеть от, например, температуры плавления и кипения реагентов и растворителя, если он присутствует; термодинамики реакции (например, может потребоваться проведение сильно экзотермических реакций при пониженных температурах); и кинетики реакции (например, повышенные температуры может потребоваться для преодоления высокой активации энергетического барьера). "Повышен-

ная температура" относится к температуре выше комнатной температуры (около 22°C).

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть проведены на воздухе или в инертной атмосфере. Как правило, реакции, которые содержат реагенты или продукты, которые существенно вступают во взаимодействие с воздухом, могут быть проведены, используя чувствительные к воздействию воздуха методики синтеза, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

При получении соединений согласно способам описанных в данном документе, могут быть использованы обычные действия по выделению и очистке, такие как концентрация, фильтрация, экстракция, твердофазная экстракция, перекристаллизация, хроматография и т.п., чтобы выделить требуемый продукт.

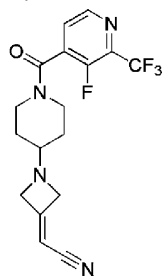
В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, и их соли, в существенной степени выделены. Под "в существенной степени выделенный" подразумевают, что соединение по меньшей мере частично или существенно отделено от среды, в которой оно образовано, или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию обогащенную соединением по данному изобретению. Существенное разделение может включать композиции, которые содержат по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% по весу соединения данного изобретения, или его соль. Методы выделения соединений и их солей являются обычными в данной области техники.

Способы получения некоторых промежуточных продуктов можно найти в предварительной патентной заявке США № 61/531896, поданной 7 сентября 2011, патентной заявке США № 12/687623, поданной 14 января 2010, и патентной заявке США № 13/043986, поданной 9 марта 2011, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Способы и промежуточные соединения

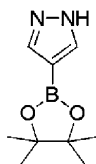
В данном изобретении предложены способы получения соединения формулы I. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу, включающему:

взаимодействие соединения формулы VIII:



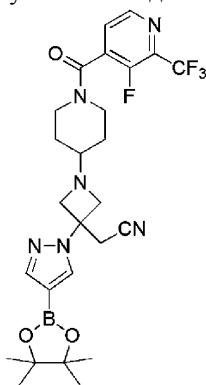
VIII

с соединением формулы IXa:



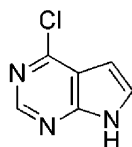
IXa

в присутствии агента связывания с получением соединения формулы VIIa:



VIIa

и взаимодействие соединения формулы VIIa с соединением формулы IVa:



IVa

в условиях реакции сочетания Сузуки с получением соединения формулы I, где условия реакции сочетания Сузуки включают нагревание реакционной смеси, содержащей соединение формулы VIIa, соединение формулы IVa, катализатора реакции сочетания Сузуки, основание и второй компонент растворителя.

В некоторых вариантах реализации изобретения агент связывания представляет собой 1,8-диазацикло[5,4,0]ундецен.

В некоторых вариантах реализации изобретения взаимодействие соединения формулы VIII с соединением формулы IXa:

(a) проводят в компоненте растворителя, содержащего ацетонитрил; и

(b) проводят в компоненте растворителя, содержащего ацетонитрил, при температуре от 40 до 60°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения используют от 1 до 1,2 эквивалента соединения формулы IXa исходя из соединения формулы VIII.

В некоторых вариантах реализации изобретения катализатор реакции сочетания Сузуки представляет собой тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0).

В некоторых вариантах реализации изобретения основание представляет собой бикарбонат натрия.

В некоторых вариантах реализации изобретения бикарбонат натрия присутствует в количестве 4 или более эквивалентов исходя из соединения формулы VIIa.

В некоторых вариантах реализации изобретения второй компонент растворителя содержит 1,4-диоксан и воду.

В некоторых вариантах реализации изобретения 1,4-диоксан и вода присутствуют в объемном соотношении 1:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединения формул VIIa и IVa присутствуют в мольном соотношении 1:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения условия реакции сочетания Сузуки включают нагревание реакционной смеси, содержащей соединение формулы VIIa, соединение формулы IVa, тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0), бикарбонат натрия и второй компонент растворителя, и где второй компонент растворителя включает воду и 1,4-диоксан.

Реакция Сузуки в способах описанных в данном документе, может быть инициирована с помощью ряда различных известных катализаторов Сузуки, в том числе катализаторов на основе палладия (0) и палладия (II), и проведена в условиях, известных в данной области техники (см., например, Miyauga и Suzuki, Chem. Rev. 1995, 95, 2457-2483, которая включена в полном объеме в данное описание).

Применение.

Соединение формулы I, {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил]пиперидин-4-ил}-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил]азетидин-3-ил}ацетонитрил, является ингибитором JAK (например, JAK1, JAK2). Ингибиторы JAK применяют при лечении различных JAK-ассоциированных заболеваний или расстройств. Примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают заболевания, связанные с иммунной системой, включая, например, отторжения трансплантированного органа (например, отклонение аллотрансплантата и реакция "трансплантат против хозяина"). Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают аутоиммунные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, псориатический артрит, диабет типа I, волчанка, псориаз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, миастения, нефропатия иммуноглобулинов, миокардит, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения, аутоиммунные заболевания представляют собой буллезные аутоиммунное заболевание кожи такие как пузырчатка обыкновенная (ПО) или буллезный пемфигоид (БП).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают аллергические состояния, такие как астма, пищевая аллергия, экзематозные дерматиты, контактный дерматит, атопический дерматит (экзема) перемещенный и ринит.

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают вирусные заболевания, такие как вирус Эпштейн-Барр (EBV), гепатит B, гепатит C, ВИЧ, HTLV 1, вирус ветряной оспы (ВВО) и вирус папилломы человека (ВПЧ).

Дополнительные примеры JAK-ых заболеваний включают заболевания, связанные с оборотом хряща, например, подагрический артрит, септический или инфекционный артрит, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, алгодистрофия, синдром Титце, реберная артропатия, эндемичный деформирующий остеоартроз, болезни Мселени, болезнь Хандигоду, фибромиалгия которая приводит к

дегенерации, системная красная волчанка, склеродермия, или анкилозирующий спондилит.

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают врожденные пороки развития хряща, в том числе наследственной хондролиз, хондродисплазии и остеохондродисплазии (например, микрогния, аногия и метафиза хондродисплазия).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний или паталогических состояний включают кожные заболевания, такие как псориаз (например, псориаза), атопический дерматит, кожная сыпь, раздражение кожи, повышенная чувствительность кожи (например, контактный дерматит или аллергический контактный дерматит). Например, некоторые вещества, включая некоторые лекарственные препараты при местном применении, могут вызвать раздражение кожи. В некоторых вариантах реализации изобретения, одновременное введение или последовательное введение по меньшей мере одного ингибитора JAK в соответствии с данным изобретением с агентом вызывают нежелательную сенсибилизацию, могут быть полезны в лечении такой нежелательной сенсибилизации или дерматита. В некоторых вариантах реализации изобретения, заболевание кожи лечат с помощью местного введения по меньшей мере одного ингибитора JAK по данному изобретению.

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний или состояний включают такие, которые характеризуются солидными опухолями (например, рак предстательной железы, рак почки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак молочной железы, рак легкого, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластомы, саркома Капоши, болезнь Кастлемана, лейомиосаркома матки, меланома и т.д.), гематологический рак (например, лимфома, лейкемия, такая как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) или множественная миелома), рак кожи и, например, кожная Т-клеточная лимфома (СТСЛ) и кожная В-клеточная лимфома. Пример СТСЛs включают синдром Сезари и фунгоидный микоз. Другие примеры JAK-ассоциированных заболеваний или состояний включают легочную артериальную гипертензию.

Другие примеры JAK-ассоциированных заболеваний или состояний включают виды рака, ассоциированные с воспалением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак ассоциирован с воспалительным заболеванием кишечника. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит. В некоторых вариантах реализации изобретения болезнь воспаленного кишечника представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах реализации изобретения, рак, ассоциированный с воспалением, представляет собой колит-ассоциированный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения, рак, ассоциированный с воспалением, представляет собой рак толстой кишки или колоректальный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак желудка, желудочно-кишечную карциноидную опухоль, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), аденокарциномы, рак тонкой кишки, или рак прямой кишки.

JAK-ассоциированные заболевания могут дополнительно включать заболевания, характеризующиеся экспрессией: JAK2 мутантов, таких как те, которые имеют по крайней мере одну мутацию в область псевдо-киназы (например, JAK2V617F); JAK2 мутантов, обладающих по меньшей мере, одной мутацией вне области псевдо-киназы; JAK1 мутанты; JAK3 мутантов; мутантов рецепторов эритропоэтина (Ерог); или дисрегулированной экспрессией CRLF2.

JAK-ассоциированные заболевания могут дополнительно включать миелолипролиферативные расстройства (ПДС), такие как истинная полицитемия (PV), эфирная тромбоцитемия (ЕТ), миелофиброз с миелоидной метаплазией (МММ), первичный миелофиброз (ИМП), хронический миелолейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарная лейкемия (ХММЛ), гиперэозинофильный синдром (ГЭК), системный мастоцитоз (SMCD), и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения миелолипролиферативное расстройство представляет собой миелофиброз (например, первичный миелофиброз (ПМФ) или после истинную полицитемию/основную тромбоцитемию миелофиброз (Post-PV/Post-ET MF)). В некоторых вариантах реализации изобретения миелолипролиферативное расстройство представляет собой пост-основную тромбоцитемию миелофиброз (Post-ET MF). В некоторых вариантах реализации изобретения миелолипролиферативное расстройство представляет собой пост истинную полицитемию миелофиброз (Post-ПВ MF).

Другие примеры JAK-ассоциированных заболеваний или паталогических состояний включают облегчение дерматологических побочных эффектов от других лекарственных препаратов путем введения соединения по данному изобретению. Например, многочисленные фармацевтические агенты приводят к нежелательным аллергическим реакциям, которые могут проявляться в виде угревой сыпи или связаны с дерматитом. Примеры фармацевтических агентов, которые имеют такие нежелательные побочные эффекты, включают противораковые препараты, такие как гефитинибом, цетуксимаб, эрлотиниб и тому подобное. Соединения по данному изобретению могут быть введены системно или местно (например, локализованы вблизи дерматита) в сочетании с (например, одновременно или последовательно) фармацевтическим агентом, имеющим нежелательные дерматологические побочные эффекты. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения по данному изобретению могут быть введены местно вместе с одним или более, фармацевтическим препаратом, где другие фармацевтические препараты, при систематическом применении в отсутствие соединения по данному изобретению вызывают контактный дерматит, аллергический контактный сенсибилизации или подобным заболевания кожи. Соответственно,

композиции по данному изобретению включают настоящие композиции, которые содержат соединения по данному изобретению и дополнительно фармацевтический агент, который может вызвать дерматит, кожные заболевания или имеющий связанные с этим побочные эффекты.

Дополнительно JAK-ассоциированные заболевания включают воспаление и воспалительные заболевания. Пример воспалительных заболеваний включают саркоидоз, воспалительные заболевания глаза (например, ирит, увеит, склерит, конъюнктивит, или похожих заболеваний), воспалительные заболевания дыхательных путей (например, верхних дыхательных путей, включая нос и пазухи, таких как ринит или синусит или нижних дыхательных путей, включая бронхит, хроническую обструктивную болезнь легких, и тому подобное), воспалительная миопатия, такая как миокардит, и других воспалительных заболеваний. В некоторых вариантах реализации изобретения, воспалительные заболевания глаз представляет собой блефарит.

Дополнительно JAK-ассоциированные заболевания включают ишемию реперфузии повреждения или заболевания или состояния, относящуюся к воспалительным ишемическим явлениям, таким как инсульт или остановка сердца, эндотоксин-управляемые болезненные состояния (например, осложнений после операции шунтирования или хронических состояний эндотоксина, способствующих хронической сердечной недостаточности), анорексия, кахексия, усталость, которая является результатом или связанной с раком, рестеноз, склеродермиты, фиброзы, состояния, связанные с гипоксией или астроглиозом, такой как, например, диабетическая ретинопатия, рак, или нейродегенерация и другие воспалительные заболевания, такие как синдром системного воспалительного ответа (ССВО) и септический шок.

Другие JAK-ассоциированные заболевания включают подагру и увеличенный размер простаты из-за, например, доброкачественной гипертрофии предстательной железы или доброкачественной гиперплазии предстательной железы, а также заболевания костной резорбции, таких как остеопороз или остеоартрит, заболевания костной резорбции, связанные с: гормональным дисбалансом и/или гормональной терапией, аутоиммунными заболеваниями (например, костным саркоидозом), или раком (например, миеломой).

Дополнительно JAK-ассоциированные заболевания включают "расстройства сухого глаза". Как используют в данном документе, "расстройство сухого глаза" охватывает болезненные состояния, обобщенные в недавнем официальном докладе о семинаре-практикуме Сухой Глаз (СПСГ), который определил сухой глаз, как "многофакторную болезнь слез и глазной поверхности, что приводит к симптомам дискомфорта, нарушения зрения, и неустойчивости слезоточивой пленки с потенциалом повреждения глазной поверхности. Это сопровождается увеличением осмолярности слезной пленки и воспалением глазной поверхности." Lemp, " The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop", The Ocular Surface, 5(2), 75-92 апрель 2007, который включен в в полном объеме в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения, расстройство сухого глаза выбран из водного дефицита слез сухого глаза (ВДСГ) или испаряющего расстройства сухого глаза, или соответствующие их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство сухого глаза представляет собой синдром Шегреновского сухого глаза (СШСГ). В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство сухого глаза представляет собой не-Шегреновский синдром сухого глаза (НСШСГ).

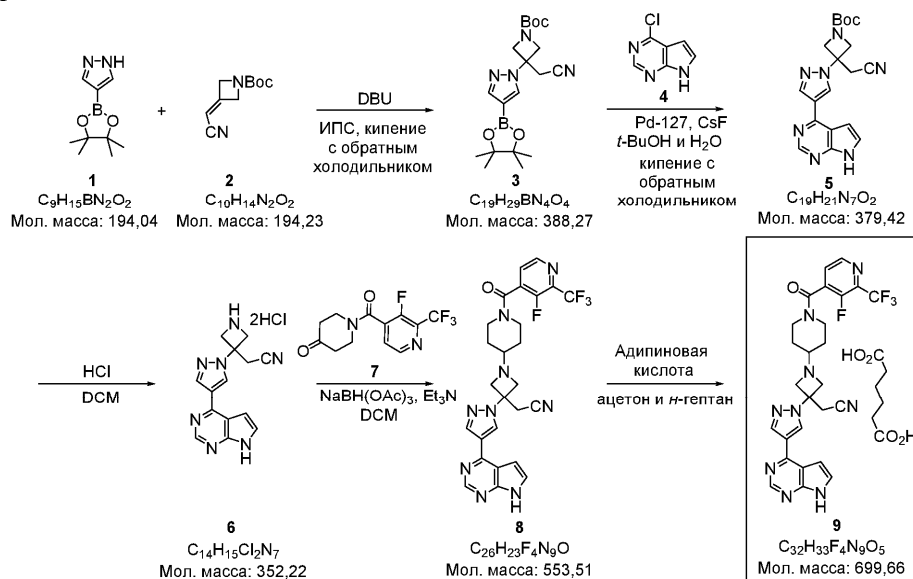
Дополнительно JAK-ассоциированные заболевания включают конъюнктивит, увеит (в том числе хронический увеит), хориодит, ретинит, циклит, склерит, эписклерит, или ирит. Другие JAK-ассоциированные заболевания включают дыхательную дисфункцию или отказ, связанные с вирусной инфекцией, например, гриппом и ОРВИ.

Примеры

Данное изобретение будет описано более подробно с помощью конкретных примеров. Следующие примеры представлены с целью иллюстрации, и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом. Специалисты в данной области техники легко поймут различные не критические параметры, которые могут быть изменены или модифицированы, чтобы привести по существу к тем же самым результатам.

Пример 1. Синтез 2-(3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил адипата (9)

Схема I



трет-Бутил 3-(цианметил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-1-карбоксилат (3).

В 1 л колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и механической мешалкой последовательно добавляли изопропанол (ИПС, 200 мл), 1,8-диазацикло[5,4,0]ундецен (ДБУ, 9,8 г, 64,4 ммоль, 0,125 экв), 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (1, 101 г, 520,51 ммоль, 1,01 экв) и трет-бутил-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилат (2, 100 г, 514,85 ммоль) при комнатной температуре, чтобы генерировать реакционную смесь в виде суспензии. Полученную реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 30 мин с получением гомогенного раствора, и смесь выдерживали при кипячении с обратным холодильником в течение дополнительных 2-3 ч. После того, как реакция была завершена, контроль осуществляли по ВЭЖХ, н-гептан (400 мл) постепенно добавляли к реакционной смеси в течение 45 мин при поддержании кипения смеси с обратным холодильником. Сухой остаток осаждали во время добавления н-гептана. После завершения добавления н-гептана, смесь постепенно охлаждали до комнатной температуры и перемешивали при температуре окружающей среды в течение дополнительного 1 часа. Твердый остаток был собран при фильтрации, промыт н-гептаном (200 мл), и высушен под вакуумом при 50°C с установлением равновесия с азотом до постоянной массы с получением трет-бутил-3-(цианометил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-1-карбоксилата (3, 181 г, 199,9 г теоретический, 90,5%) в виде от белого до бледно-желтого твердого вещества. Для 3: 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,31 (с, 1H), 7,74 (с, 1H), 4,45-4,23 (м, 2H), 4,23-4,03 (м, 2H), 3,56 (с, 2H), 1,38 (с, 9H), 1,25 (с, 12H) м.д.; ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6) δ 155,34, 145,50, 135,88, 116,88, 107,08 (уш), 83,15, 79,36, 58,74 (уш), 56,28, 27,96, 26,59, 24,63 м.д.; $C_{19}H_{29}BN_4O_4$ (Мол.масса 388,27), ВЖМС (EI) m/e 389 (M^++H).

трет-Бутил-3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилат (5). В 1 л колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и механической мешалкой добавляли 4-хлоро-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин (4, 39,6 г, 257,6 ммоль), трет-бутил-3-(цианметил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-1-карбоксилат (3, 100 г, 257,6 ммоль, 1,0 экв), фторид цезия (136,9 г, 901,4 ммоль, 3,5 экв), трет-бутанол (250 мл), воду (250 мл), и [1,1'-бис(ди-циклогексилфосфино) ферроцен] дихлорпалладий (II) (Pd-127, 351,4 мг, 0,46 ммоль, 0,0018 экв) при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь дегазировали и заполняли азотом 3 раза, прежде чем нагрели до температуры кипения и выдерживали при кипении с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 20-24 ч. Когда данные ВЭЖХ показали, что реакция завершена, реакционную смесь охлаждали до 45-55°C 30 мин, произошло разделение на две фазы, водную фазу отбрасывали. В органическую фазу добавляли н-гептан (125 мл) в течение 30 мин при 45-55°C. Полученную смесь медленно охлаждали до температуры окружающей среды в течение одного часа и перемешивали при температуре окружающей среды в течение дополнительных 2 ч. Твердый остаток собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (100 мл), и сушили под вакуумом при 50°C с установлением равновесия с азотом до постоянной массы с получением трет-бутил-3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилата (5, 96,8 г, 97,7 г теоретический, 99%) в виде бледно-желтого твердого вещества. Для 5: 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,89 (с, 1H), 8,68 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 7,60 (д, J=3,5 Гц, 1H), 7,06 (д, J=3,6 Гц, 1H), 4,62-4,41 (м, 2H), 4,31-4,12 (м, 2H), 3,67 (с, 2H), 1,39 (с, 9H) м.д.; ^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6) δ 155,40, 152,60, 150,63, 149,15, 139,76, 129,53, 127,65, 122,25, 116,92, 113,21, 99,71, 79,45, 58,34 (уш), 56,80, 27,99, 26,83 м.д.; $C_{19}H_{21}N_7O_2$

(Мол.масса 379,4), ВЖМС (EI) m/e 380 (M⁺+H).

2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил дигидрохлорид (6). В 0,5-литровую колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой, воронкой дополнительный, и механической мешалкой были добавлены трет-бутил-3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилат (5, 15 г, 39,5 ммоль), вода (7,5 мл, 416 ммоль) и дихлорметан (75 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды до получения суспензии. К суспензии был добавлен раствор 5 М хлорида водорода (HCl) в изопропанол (55 мл, 275 ммоль, 7,0 экв) в течение 5 мин. Полученную реакционную смесь нагревали при слабом кипении и выдерживают при кипении в течение 3-4 ч. После того как реакция была завершена, что контролировали с помощью ВЭЖХ, трет-бутилметилловый эфир (ТВМЕ, 45 мл) добавляли к реакционной суспензии. Смесь постепенно охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение еще одного часа. Твердый остаток собирали фильтрованием, промывали трет-бутилметилловым эфиром (ТВМЕ, 45 мл) и сушили под вакуумом при 50°C с установлением равновесия с азотом до постоянной массы с получением дигидрохлоридной соли 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрила (6, 13,6 г, 13,9 г теоретический, 98%) в виде от почти белого до светло-желтого твердого вещества. Для 6: ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 8,96 (с, 1Н), 8,81 (с, 1Н), 8,49 (с, 1Н), 7,78 (д, J=3,8 Гц, 1Н), 7,09 (д, J=3,7 Гц, 1Н), 4,93 (д, J=12,8 Гц, 2Н), 4,74 (д, J=12,5 Гц, 2Н), 3,74 (с, 2Н) м.д.; ¹³C ЯМР (101 МГц, D₂O) δ 151,35, 143,75, 143,33, 141,33, 132,03, 131,97, 115,90, 114,54, 113,85, 103,18, 59,72, 54,45 (2С), 27,02 м.д.; C₁₄H₁₅Cl₂N₇ (C₁₄H₁₃N₇ для свободного основания, масса 279,30), ВЖМС (EI) m/e 280 (M⁺+H).

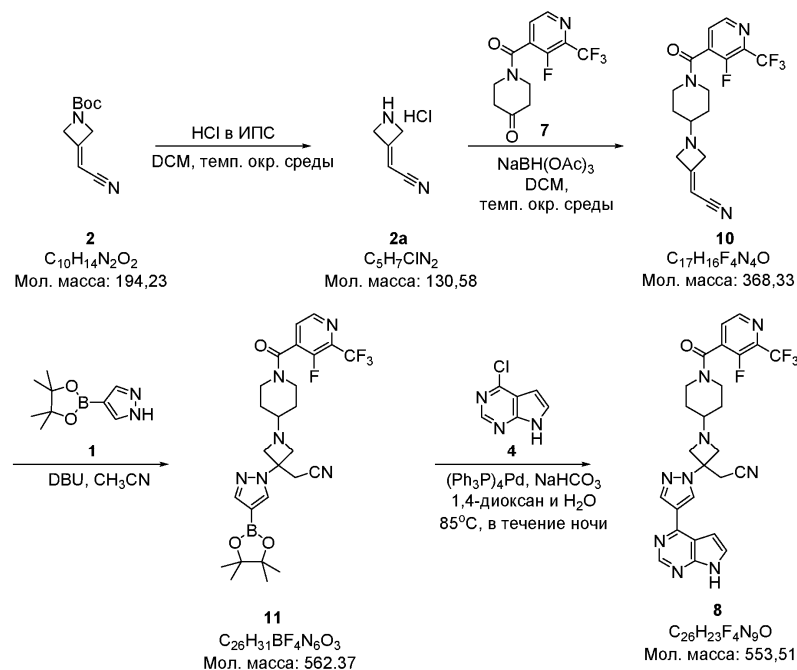
2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (8, Свободное Основание). В 0,5-литровую колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой, дополнительной воронкой, и механической мешалкой были добавлены дигидрохлоридная соль 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (6, 20 г, 5 6,78 ммоль), дихлорметан (200 мл) и триэтиламин (ТЕА, 16,62 мл, 119,2 ммоль, 2,1 экв) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды 30 мин до добавления 1-(3-фтор-2-(трифторметил)-изоизоникотиноил)пиперидин-4-она (7, 17,15 г, 57,91 ммоль, 1,02 экв) к смеси. Затем смесь обрабатывали триацетоксиборгидридом натрия (25,34 г, 113,6 ммоль, 2,0 экв) в течение 5 мин при температуре окружающей среды (ниже 26°C). Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды два часа. После того, как реакция была завершена, что контролировали с помощью ВЭЖХ, реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NaHCO₃ (200 мл). Две фазы разделяли и водную фазу экстрагировали хлористым метиленом (200 мл). Объединенную органическую фазу промывали 4% соевым раствором (100 мл) с последующей заменой растворителя хлористого метилена на ацетон путем перегонки. Полученный раствор желаемого сырого продукта (8) в ацетоне использовали непосредственно для последующего получения соли адипиновой кислоты. Небольшую часть раствора очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, 0-10% MeOH в EtOAc градиентное элюирование) с получением аналитически чистого

2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрила (8 свободное основание) в виде почти белого твердого вещества. Для 8: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 12,17 (д, J=2,8 Гц, 1Н), 8,85 (с, 1Н), 8,70 (м, 2Н), 8,45 (с, 1Н), 7,93 (т, J=4,7 Гц, 1Н), 7,63 (дд, J=3,6, 2,3 Гц, 1Н), 7,09 (дд, J=3,6, 1,7 Гц, 1Н), 4,10 (м, 1Н), 3,78 (д, J=7,9 Гц, 2Н), 3,61 (т, J=7,9 Гц, 1Н), 3,58 (с, 2Н), 3,46 (м, 1Н), 3,28 (т, J=10,5 Гц, 1Н), 3,09 (ддд, J=13,2, 9,5, 3,1 Гц, 1Н), 2,58 (м, 1Н), 1,83-1,75 (м, 1Н), 1,70-1,63 (м, 1Н), 1,35-1,21 (м, 2Н) м.д.; ¹³C ЯМР (101 МГц, DMSO-d₆) δ 160,28, (153,51, 150,86), 152,20, 150,94, 149,62, (146,30, 146,25), 139,48, (134,78, 134,61), (135,04, 134,92, 134,72, 134,60, 134,38, 134,26, 134,03, 133,92), 129,22, 127,62, 126,84, 121,99, 122,04, (124,77, 122,02, 119,19, 116,52), 117,39, 113,00, 99,99, 61,47, 60,49, 57,05, 44,23, 28,62, 27,88, 27,19 м.д.; C₂₆H₂₃F₄N₉O (Мол.масса 553,51), ВЖМС (EI) m/e 554,1 (M⁺+H). 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил адипат (9). В 0,5-литровую колбу, снабженную механической мешалкой, термопарой, капельной воронкой и краном ввода азота, был добавлен раствор неочищенного 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрила (8 свободное основание, 31,38 г, 56,7 ммоль) в ацетоне (220 мл) и адипиновая кислота (8,7 г, 59,53 ммоль, 1,05 экв) при комнатной температуре. Затем реакционную смесь нагревали с обратным холодильником для получения раствора, n-Гептан (220 мл) постепенно добавляли к реакционной смеси при 40-50°C в течение одного часа. Полученную смесь постепенно охлаждали до комнатной температуры в течение одного часа и перемешивали при температуре окружающей среды в течение дополнительных 16 ч. Твердый остаток собирали фильтрованием, промывали n-гептаном (2×60 мл), и сушили под вакуумом при 50°C с установлением равновесия с азотом до постоянной массы с получением 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил адипата (9, 34,0 г, 39,7 г теоретический, 85,6% для двух стадий) в виде от белого до совсем белого твердого вещества. 9: ¹H ЯМР

(400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,16 (с, 1H), 12,05 (уш, 2H), 8,85 (с, 1H), 8,72 (с, 1H), 8,69 (д, J=4,7 Гц, 1H), 8,45 (с, 1H), 7,93 (т, J=4,7 Гц, 1H), 7,63 (дд, J=3,6, 2,3 Гц, 1H), 7,09 (дд, J=3,6, 1,7 Гц, 1H), δ 4,11 (дт, J=11,0, 4,4 Гц, 1H), 3,77 (д, J=7,8 Гц, 2H), 3,60 (т, J=7,8 Гц, 2H), 3,58 (с, 2H), 3,44 (дт, J=14,4, 4,6 Гц, 1H), 3,28 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,09 (ддд, J=13,2, 9,6, 3,2 Гц, 1H), 2,58 (тт, J=8,6, 3,5 Гц, 1H), 2,28-2,17 (м, 4H), 1,83-1,74 (м, 1H), 1,67 (д, J=11,0 Гц, 1H), 1,59-1,46 (м, 4H), 1,37-1,21 (м, 2H) м.д.; ¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆) δ 174,38, 160,29, (153,52, 150,87), 152,20, 150,94, 149,63, (146,30, 146,25), 139,48, (134,79, 134,62), (135,08, 134,97, 134,74, 134,62, 134,38, 134,28, 134,04, 133,93), 129,21, 127,62, 126,84, 122,05, (124,75, 122,02, 119,29, 116,54), 117,39, 113,01, 99,99, 61,47, 60,50, 57,06, 44,24, 33,42, 30,70, 28,63, 27,89, 27,20, 24,07 м.д.; C₃₂H₃₃F₄N₉O₅ (Мол.масса 699,66; C₂₆H₂₃F₄N₉O для свободного основания, Мол.масса, 553,51), ВЖМС (EI) m/e 554,0 (M⁺+H).

Пример 2: Альтернативный синтез 2-(3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрила.

Схема II



2-(Азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорид (2a). В 0,5-литровую колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и механической мешалкой, были добавлены трет-бутил-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилат (2, 30 г, 154,46 ммоль) и метиленхлорид (300 мл) при температуре окружающей среды. Затем раствор обрабатывали раствором 5 М хлористого водорода (HCl) в раствора изопропанола (294,2 мл, 1,54 моль, 10 экв) при температуре окружающей среды и полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды 18 ч. После завершения реакции, что определяли с помощью ВЭЖХ, добавляли суспензию трет-бутилметилового эфира (ТБМЭ, 150 мл), и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Твердый остаток собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (2×100 мл), и сушили на фильтровальной воронке при температуре окружающей среды в течение 3 часов для получения 2-(азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорида (2a, 13,7 г, 20,2 г теоретический, 67,8%) в виде белого твердого вещества. Для 2a: ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,99 (с, 2H), 5,94 (п, J=2,5 Гц, 1H), 4,85-4,80 (м, 2H), 4,77-4,71 (м, 2H) м.д.; ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО-d₆) δ 155,65, 114,54, 94,78, 55,26, 54,63 м.д.; C₅H₇ClN₂ (Мол.масса 130,58; C₅H₆N₂ для свободного основания, Мол.масса 94,11), ВЖМС (EI) m/e 95 (M⁺+H). 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-илиден)ацетонитрил (10). В 0,25 л колбу, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и магнитной мешалкой, были добавлены 2-(азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорид (2a, 4,5 г, 34,46 ммоль), 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-он (7, 10 г, 34,46 ммоль, 1,0 экв), и метиленхлорид (100 мл) при температуре окружающей среды и полученную смесь затем обрабатывали триацетоксиборгидридом натрия (14,6 г, 68,93 ммоль, 2,0 экв) при температуре окружающей среды. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды два часа перед гашением насыщенным раствором бикарбоната натрия (NaHCO₃) в воде (50 мл). Две фазы разделили и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (200 мл). Объединенную органическую фазу промывали водой (50 мл) и насыщенным раствором соли (50 мл) и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного желаемого продукта (10), который очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, 0-10% этилацетат в гексане при градиентном элюировании) с получением 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-

илиден)ацетонитрила (10, 9,5 г, 12,7 г теоретический, 74,8%) в виде белого твердого вещества. Для 10: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,57 (д, $J=4,7$ Гц, 1H), 7,54 (т, $J=4,6$ Гц, 1H), 5,29 (п, $J=2,4$ Гц, 1H), 4,18-4,08 (м, 1H), 4,08-4,03 (м, 2H), 3,98-3,94 (м, 2H), 3,57-3,39 (м, 2H), 3,17-3,04 (м, 1H), 2,56 (тт, $J=7,4$, 3,5 Гц, 1H), 1,86-1,77 (м, 1H), 1,75-1,64 (м, 1H), 1,54-1,43 (м, 1H), 1,43-1,31 (м, 1H) м.д.; ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3) δ 161,34, 160,73, 152,62 (д, $J=269,1$ Гц), 145,75 (д, $J=6,1$ Гц), 136,73 (qd, $J=36,1$, 12,0 Гц), 134,56 (д, $J=16,9$ Гц), 126,89, 120,58 (кв. д., $J=275,0$, 4,9 Гц), 115,11, 92,04, 62,05, 60,57 (2С), 44,47, 39,42, 29,38, 28,47 м.д.; $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}$ (Мол.масса 368,33), ВЖМС (EI) m/e 369 (M^++H).

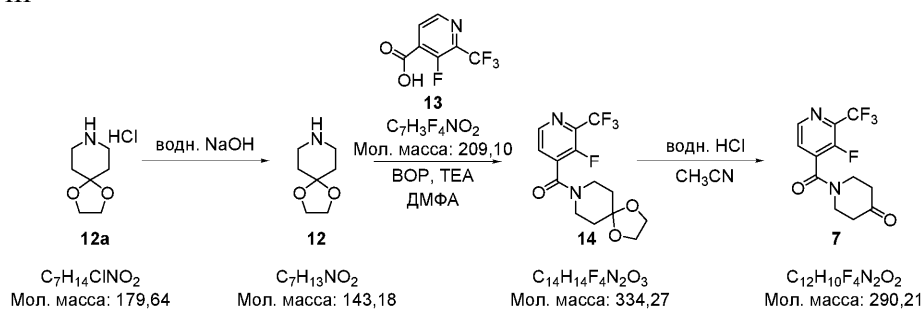
2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (11). В колбу 25 мл, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и магнитной мешалкой, были добавлены 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (1, 210 мг, 1,08 ммоль, 1,08 экв), 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-илиден)ацетонитрил (10, 370 мг, 1,0 ммоль) и ацетонитрил (3 мл) при температуре окружающей среды. Затем раствор обработали 1,8-диазабицикло[5,4,0]ундец-ен (ДБУ, 173 мг, 0,17 мл, 1,12 ммоль, 1,12 экв) при температуре окружающей среды и полученную реакционную смесь нагревали до 50°C и перемешивали при 50°C в течение ночи. Когда реакция была завершена, что определялось с помощью ВЭЖХ, реакционную смесь перенесли прямо на силикагельную колонку для хроматографического очищения (0-2,5% MeOH в этилацетате градиентное элюирование) С получением 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрила 11, 263 мг, 562,4 мг теоретический, 46,7%) в виде белого твердого вещества. Для 11: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,64 (д, $J=4,7$ Гц, 1H), 8,22 (д, $J=0,6$ Гц, 1H), 7,88 (дд, $J=4,7$ Гц, 1H), 7,69 (с, 1H), 4,10-3,99 (м, 1H), 3,58 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 3,52-3,42 (м, 2H), 3,44 (с, 2H), 3,41-3,33 (м, 1H), 3,28-3,15 (м, 1H), 3,03 (ддд, $J=12,9$, 9,2, 3,2 Гц, 1H), 2,51-2,44 (м, 1H), 1,77-1,66 (м, 1H), 1,64-1,54 (м, 1H), 1,28-1,17 (м, 2H), 1,24 (с, 12H) м.д.; ^{13}C ЯМР (101 МГц, DMSO-d_6) δ 160,22, 152,13 (д, $J=265,8$ Гц), 146,23 (д, $J=5,7$ Гц), 145,12, 135,41, 134,66 (д, $J=16,9$ Гц), 134,43 (qd, $J=35,0$, 11,7 Гц), 127,58, 120,61 (qd, $J=274,4$, 4,6 Гц), 117,35, 106,59 (уш), 83,10, 61,40, 60,53 (2С), 56,49, 44,17, 38,99, 28,55, 27,82, 27,02, 24,63 м.д.; $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BF}_4\text{N}_6\text{O}_3$ (Мол.масса 562,37), ВЖМС (EI) m/e 563 (M^++H).

2-(3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (8). В колбу 25 мл, снабженную впускным отверстием для азота, термопарой и магнитной мешалкой, были добавлены 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (11, 307 мг, 0,546 ммоль), 4-хлор-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин (4, 84,8 мг, 0,548 ммоль, 1,0 экв), бикарбонат натрия (NaHCO_3 , 229 мг, 2,72 ммоль, 5,0 экв), вода (1,6 мл), и 1,4-диоксин (1,6 мл) при комнатной температуре. Смесь затем обрабатывали тетракис(трифенилфосфин)палладием (0) (12,8 мг, 0,011 ммоль, 0,02 экв) при температуре окружающей среды и полученную реакционную смесь дегазировали и наполняли азотом 3 раза перед нагревом до 85°C. Реакционная смесь перемешивалась при 85°C в атмосфере азота в течение ночи. Когда реакция была завершена, что определялось с помощью ВЭЖХ, реакционную смесь концентрировали досуха при пониженном давлении и желаемый продукт, 2-(3-(4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1H-пиразол-1-ил)-1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил (8 свободное основание, 135 мг, 302,2 мг теоретический, 44,6%), был получен в виде не совсем белого твердого вещества при непосредственном очищении на силикагельной (SiO_2) хроматографической колонке (0-10% этилацетат в гексане градиентное элюирование) высушенной реакционной смеси.

Соединение полученное таким способом синтеза идентично во всех сопоставимых аспектах соединению 8, полученному при применении способа синтеза, описанного выше в примере 1.

Пример 3. Синтез (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанона.

Схема III



(3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанон (14). В 30л реактор, оснащенный механической мешалкой, капельной воронкой и септой, загружали гидроксид натрия (NaOH , 1,4 кг, 35 моль, 2,0 экв) и воду (7 л) и полученный раствор обработали 1,4-диокса-8-

азаспиро[4,5]декан гидрохлоридом (3,13 кг, 17,43 моль) при температуре окружающей среды. Затем полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды 30 мин перед насыщением твердым хлоридом натрия (1,3 кг) и экстрагировали 2-метил-тетрагидрофураном (3×7 л). Объединенную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия (Na₂SO₄, 1,3 кг) и концентрируют при пониженном давлении (70 мм рт.ст.) при 50°C после удаления осушающего реактива, сульфата натрия (Na₂SO₄), фильтрованием. Полученное таким образом желтое масло перегнали при пониженном давлении (80 мм рт.ст., точка кипения от 115 до 120°C) с получением 1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декана (2,34 кг, 2,496 кг теоретический, 93,8%) в виде прозрачного масла, которое непосредственно применяют в последующей реакции кросс-сочетания.

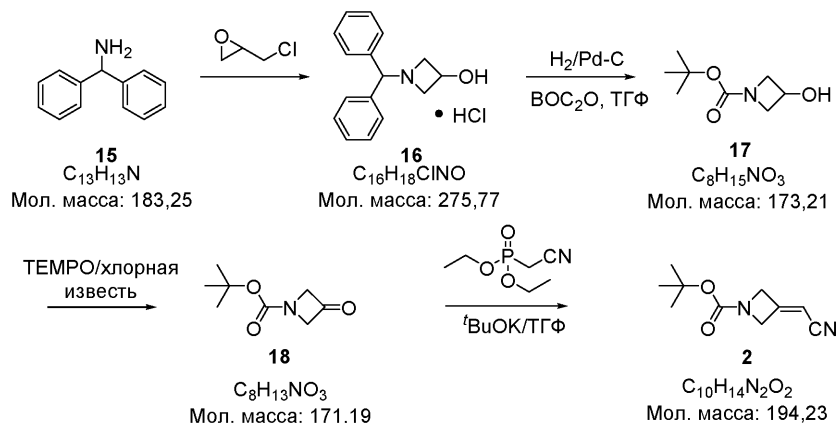
В сухой 100 л реактор, оснащенный механической мешалкой, капельной воронкой, термометром и вакуумным выпускным отверстием, загружали 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиновую кислоту (13,30 кг, 14,35 моль), бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (реагент ВОР, 7,6 кг, 17,2 моль, 1,2 экв), 1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан (2,34 кг, 16,36 моль, 1,14 экв) и N,N-диметилформамид (ДМФ, 18 л) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 20 мин перед охлаждением от 5 до 10°C. Затем триэтиламин (Et₃N, 4 л, 28,67 моль, 2,0 экв) добавляли в реакционную смесь в течение 1 часа и внутренняя температура поддерживалась в пределах от 5 и 10°C во время добавления триэтиламина. Полученный таким образом темно-коричневый раствор перемешивали в течение 12 ч при температуре окружающей среды (приблизительно 20°C) и затем охлаждали до около 10°C. При интенсивном перемешивании 18 л насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (NaHCO₃) и 36 л воды последовательно добавляли к охлажденной реакционной смеси и выдерживали внутреннюю температуру до 15°C. Осадок (осадок на фильтре), полученный таким образом собирают фильтрацией. Водную фазу затем насыщают 12 кг твердого хлорида натрия (NaCl) и экстрагируют EtOAc (2×18 л). Объединенный органический слой последовательно промывали насыщенным бикарбонатом натрия (NaHCO₃) водным раствором (18 л), и водой (2×18 л). Собранный осадок на фильтре затем растворяли обратно в органической фазе и полученный темно-коричневый раствор промывали водой (2×18 л), а затем концентрировали при пониженном давлении (40-50°C, 30 мм рт.ст.) с получением приблизительно 5,0 кг неочищенного целевого продукта (14) в виде вязкого масла коричневого цвета. Неочищенный продукт, полученный выше, затем растворяли в EtOH (8,15 л) при 50°C и полученный раствор обрабатывали водой (16,3 л) в течение 30 минут при приблизительно 50°C. Коричневый раствор был отобран, перед тем, как постепенно охлажден до температуры окружающей среды (около 20°C) в течение 3 ч при перемешивании и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 12 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали смесью этанола и воды (EtOH:H₂O=1:20, 2 л) и сушили при пониженном давлении (50 мм рт.ст.) при температуре приблизительно 60°C в течение 24 ч с получением (3-фтор-2-(трифторметил) пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанона (14, 3,98 кг, 4,797 кг теоретический, 83,0%) в виде белого твердого вещества. Для 14: ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,64 (д, ³J_{HH}=4,68 Гц, 1H, NCH в пиридине), 7,92 (д, ³J_{HH}=4,68 Гц, ⁴J_{HF}=4,68 Гц, 1H, NCCN в пиридине), 3,87-3,91 (м, 4H, OCH₂CH₂O), 3,70 (уш с, 2H, один протон NCH₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCH₂ в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,26 (т, ³J_{HH}=5,86 Гц, 2H, один протон NCH₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCH₂ в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 1,67 (д, ³J_{HH}=5,86 Гц, 2H, один протон NCCN₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCCN₂ в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 1,58 (уш с, 2H, один протон NCCN₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCCN₂ в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении) м.д.; ¹³C ЯМР (75 МГц, ДМСО-d₆) δ 161,03 (N-C=O), 151,16 (д, ¹J_{CF}=266,03 Гц, C-F), 146,85 (д, ⁴J_{CF}=4,32 Гц, NCH в пиридине), 135,24 (д, ²J_{CF}=11,51 Гц, C-C=O), 135,02 (квартет, ²J_{CF}=34,57 Гц, NCCF₃), 128,24 (д, ⁴J_{CF}=7,48 Гц, NCCN в пиридине), 119,43 (д×квартет, ¹J_{CF}=274,38 Гц, ³J_{CF}=4,89 Гц, CF₃), 106,74 (OCCO), 64,60 (OCCO), 45,34 (NC в пиперидиновом кольце), 39,62 (NC в пиперидиновом кольце), 34,79 (NCC в пиперидиновом кольце), 34,10 (NCC в пиперидиновом кольце) м.д.; ¹⁹F ЯМР (282 МГц, ДМСО-d₆) δ -64,69 (д, ⁴J_{FF}=15,85 Гц, F₃C), -129,26 (д×квартет, ⁴J_{FF}=15,85 Гц, ⁴J_{FH}=3,96 Гц, FC) м.д.; C₁₄H₁₄F₄N₂O₃ (Мол.масса, 334,27), ВЖМС (EI) t/e 335,1 (M⁺+H).

(3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанон (7). В 5 л 4-горлую круглодонную колбу, снабженную механической мешалкой, термопарой, капельной воронкой и выпускным отверстием для азота, загружали (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанон (14, 100 г, 0,299 моль) в ацетонитриле (ACN, 400 мл) при температуре окружающей среды. Полученный раствор охлаждали до температуры ниже 10°C перед обработкой 6,0 н. водным раствором соляной кислоты (HCl) (450 мл, 2,70 моль, 9,0 экв), а внутренняя температура поддерживалась на уровне ниже 10°C. Полученную реакционную смесь затем постепенно нагревали до комнатной температуры и дополнительное количество 6,0 н. водного раствора соляной кислотой (HCl) (1050 мл, 6,30 моль, 21,0 экв) медленно вводили в реакционную смесь при температуре окружающей среды в течение 8 ч через капельную воронку. Когда реакция была завершена, что контролировалось с помощью ВЭЖХ, реакционная смесь затем была охлаждена до 0°C перед тем, как была обработана 30%

водным раствором гидроксида натрия (NaOH, 860 мл, 8,57 ммоль, 28,6 экв) в то время как внутренняя температура поддерживалась на уровне ниже 10°C. Полученную реакционную смесь нагревали до комнатной температуры перед добавлением твердого бикарбоната натрия (NaHCO₃, 85,0 г, 1,01 моль, 3,37 экв) в течение 1 часа. Затем смесь экстрагировали этилацетатом (2×1,2 л) и объединенную органическую фазу промывали 16% водным раствором хлорида натрия (2×800 мл) и концентрировали приблизительно до 1,0 л с помощью вакуумной перегонки. n-Гептан (2,1 л) был добавлен к остатку, и полученную смесь концентрировали до 1,0 л с помощью вакуумной перегонки. К концентрированной смеси добавили n-гептан (2,1 л). Полученную белую суспензию концентрировали до 1,0 л с помощью вакуумной перегонки. В белую суспензию затем добавляли трет-бутилметилэфир (МТБЭ, 1,94 л). Белый мутный раствор нагревали до 40°C, чтобы получить прозрачный. Полученный раствор концентрируют до около 1,0 л с помощью вакуумной перегонки. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Белый осадок собирали фильтрованием, промывали n-гептаном (400 мл) и сушили на фильтре в атмосфере азота с тяговым вакуумом с получением (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил) (1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанола (7, 78,3 г, 86,8 г теоретический, 90,2%) в виде не совсем белого твердого вещества. Для 7: ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,68 (д, ³J_{HH}=4,69 Гц, 1H, NCH в пиридине), 7,97 (дд, ³J_{HH}=4,69 Гц, ⁴J_{HF}=4,69 Гц, 1H, NCCN в пиридине), 3,92 (уш с, 2H, один протон NCH₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCH₂ в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,54 (т, ³J_{HH}=6,15 Гц, 2H, один протон NCH₂ в пиперидиновом кольце, один протон другого NCH₂ в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 2,48 (т, ³J_{HH}=6,44 Гц, 2H, NCCN), 2,34 (т, ³J_{HH}=6,15 Гц, 2H, NCCN) м.д.; ¹³C ЯМР (75 МГц, ДМСО-d₆) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (д, ¹J_{CF}=266,89 Гц, C-F), 146,90 (д, ⁴J_{CF}=6,05 Гц, NCH в пиридине), 135,56 (C-C=O), 134,78-135,56 (м, NCCF₃), 128,27 (д, ³J_{CF}=7,19 Гц, NCCN в пиридине), 119,52 (дквартет, ¹J_{CF}=274,38 Гц, ³J_{CF}=4,89 Гц, CF₃), 45,10 (NC в пиперидиновом кольце) м.д., один углерод (NCC в пиперидиновом кольце) отсутствует из-за перекрытия с (CD₃)₂SO; ¹⁹F ЯМР (282 МГц, ДМСО-d₆) δ -64,58 (д, ⁴J_{FF}=15,85 Гц, F₃C), -128,90 (дхквартет, ⁴J_{FF}=15,85 Гц, ⁴J_{FH}=4,05 Гц, FC) м.д.; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (Мол.масса, 290,21), ВЖМС (EI) т/е 291,1 (M⁺+H).

Пример 4. Синтез трет-бутил-3-(цианметил)азетидин-1-карбоксилата.

Пример IV



1-Бензгидриазетидин-3-ол гидрохлорид (16). Раствор дифенилметанамина (2737 г, 15,0 моль, 1,04 экв) в метаноле (MeOH, 6 л) обрабатывали 2-(хлорметил)оксираном (1330 г, 14,5 моль) с помощью капельной воронки при температуре окружающей среды. В течение первоначального добавления было замечена небольшая эндотерма. Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 дней, прежде чем нагревали до кипения с обратным холодильником в течение дополнительных 3 дней. Когда ТСХ показала, что реакция считалась завершённой, реакционную смесь сначала охлаждали до комнатной окружающей среды, а затем до 0-5°C на ледяной бане. Твердые вещества собирали фильтрованием и промыли ацетоном (4 л) с получением первой порцию сырого целевого продукта (1516 г). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и полученное полутвердый продукт разбавляли ацетоном (1 л). Затем это твердое вещество собирали фильтрованием с получением второй порции сырого целевого продукта (221 г). Неочищенный продукт, 1-бензгидриазетидин-3-ол гидрохлорид (1737 г, 3998,7 г теоретический выход 43,4%), оказался достаточно чистым для использования без дополнительной очистки в последующей реакции. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,28 (уш. д, 1H), 7,7 (м, 5H), 7,49 (м, 5H), 6,38 (д, 1H), 4,72 (уш. с, 1H), 4,46 (м, 1H), 4,12 (м, 2H), 3,85 (м, 2H) м.д.; C₁₆H₁₈ClNO (Мол.масса 275, 77; C₁₆H₁₇NO для свободного основания, Мол. масса, 239,31), ВЖМС (EI) т/е 240 (M⁺+H).

трет-Бутил-3-гидроксиазетидин-1-карбоксилат (17). Суспензию 1-Бензгидриазетидин-3-ол гидрохлорида (625 г, 2,27 моль) в 10% раствора водного карбоната натрия (Na₂CO₃, 5 л) и дихлорметана (CH₂Cl₂, 5 л) перемешивали при температуре окружающей среды до полного растворения всех твердых

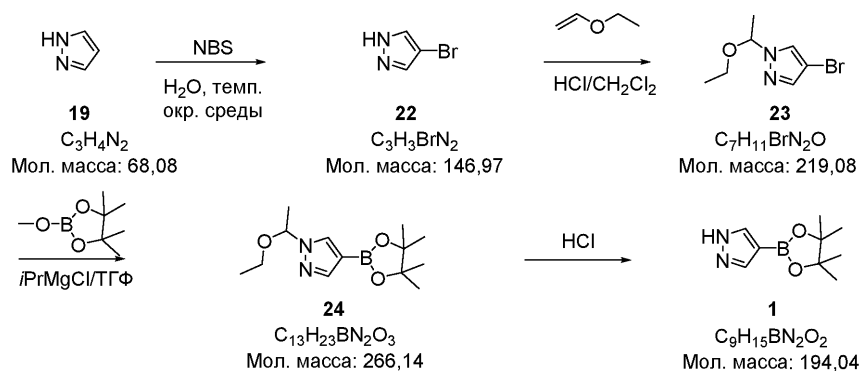
ран (ТГФ, 5 л) при температуре окружающей среды. Затем смесь охлаждали до 10°C и добавили N-йодсукцинимид (NIS, 1490 г, 6,62 моль, 1,0 экв) к смеси порциями в виде твердого вещества приблизительно при 10°C. Полученную реакционную смесь затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч (более длительное время для реакции может быть необходимо в зависимости от температуры окружающей среды). Затем смесь фильтровали и ТГФ удаляли при пониженном давлении. Остаток суспендировали в этилацетате (6 л) и нерастворимые вещества отфильтровывали. Темный фильтрат последовательно промывали насыщенным водным раствором натрия тиосульфата (2×3 л) (органический слой светлел до бледно-желтого), водой (2×3 л) и насыщенным раствором соли (2 л). Полученный органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 4-йодпиразола (1138 г, 1284,1 г теоретический, 88,6%) в виде от белого до бледно-желтого твердого вещества после сушки в вакуумной печи при около 30°C в течение ночи. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,17 (уш. с, 1H), 7,93 (уш. с, 1H), 7,55 (уш. с, 1H) м.д.; C₃H₃IN₂ (Мол. масса, 193,97) ВЖМС (EI) m/e 195 (M⁺+H).

1-Триметилсилил-4-йодпиразол (21). В колбу, снабженную обратным холодильником, впускным краном для азота, механической мешалкой, и термopарокарманом, загружали 4-йодпиразол (200 г, 1,03 моль) и ТГФ (2 л) при комнатной температуре. К этому раствору был добавлен триэтиламин (ТЭА, 158 мл, 1,13 моль, 1,1 экв) и полученный раствор охлаждали до 0°C на ледяной соляной бане. К этому раствору добавили хлортриметилсилан (ТМС-Cl, 137 мл, 1,08 моль, 1,05 экв) при энергичном перемешивании, позволяющая температуре достичь 18°C. (Реакционная смесь становится очень густой и трудно перемешивается, но со временем становится подвижной). Когда экзотермический процесс спал, холодную баню удаляли и реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью ГХ и было обнаружено, что считать завершенной ее можно после около 1 ч (выборка из реакции должна быть сделана без доступа воздуха при разбавлении сухим растворителем, чтобы предотвратить гидролиз ТМС). Реакционную смесь растворили в н-гептане (2 л) перед фильтрацией в атмосфере азота. Растворитель удаляли из фильтрата при пониженном давлении вентиляционным роторным испарителем в атмосфере азота. Остаточное масло разбавляли н-гептаном (1 л) и повторно концентрировали. Если твердые вещества образовывались при добавлении н-гептана, то была необходима вторая фильтрация. Затем остаток перегоняли при пониженном давлении (70-90°C около 0,5 торр) с использованием дистиллятора Кугельрофа, что позволяло получить 1-триметилсилил-4-йод пиразол (263 г, 274,1 г теоретический, 96%) в виде бесцветного масла. Этот материал должен храниться в атмосфере азота в любое время, поскольку ТМС группа быстро гидролизует. Впоследствии было установлено, что 1-триметилсилил-4-йодпиразол может быть получен путем нагревания иодпиразола с 2 эквивалентами гексаметилдисилазана в течение 1 ч.

4-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (1). В колбу, снабженную механической мешалкой, впускным краном для азота, капельной воронкой и термopарокарманом, были загружены 1-триметилсилил-4-йодпиразол (225,1 г, 0,85 моль) и ТГФ (2200 мл) при комнатной температуре. Смесь охлаждали около до -6°C на ледяной солевой бане перед добавлением раствора изопропилмагнийхлорида в тетрагидрофуране (2 М раствор в ТГФ, 510 мл, 1,02 моль, 1,2 экв) добавляли с такой скоростью, что внутренняя температура не превышала 0°C. Степень обмена металл/галоген контролировали с помощью ГХ и было найдено, что реакция завершается через около 10 мин. Затем к оранжево-коричневому раствору добавляли 2-изопропокси-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (изопропилпинаколат, 347 мл, 1,7 моль, 2,0 экв) сначала медленно, поддерживая температуру ниже 0°C, а затем быстрее после того, как приблизительно половина количества соединения была добавлена, позволяя температуре достичь 5°C (реакционная смесь становится довольно вязкой, а затем разжижается медленно). Затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин, до того она нагревалась до комнатной температуры в течение 1 ч и перемешивали при температуре окружающей среды в течение дополнительного 1 ч. Реакционную смесь охлаждали приблизительно до 6°C и насыщенный водный раствор хлорида аммония (NH₄Cl, 2,2 л) был добавлен с повышением температуры до 25°C. Смесь перемешивали в течение 5 мин, после чего разбавляли толуолом (10 л). Слои разделяли (большое количество твердого вещества присутствует в водном слое) и органический слой последовательно промывали водой (6×2,2 л) и насыщенным раствором соли (2×2,2 л), а затем сушили над сульфатом натрия (Na₂SO₄). Осушающий реагент, сульфат натрия (Na₂SO₄), удаляли фильтрованием и раствор концентрировали при пониженном давлении. Остаточный толуол выпаривали совместно с н-гептаном с получением 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола (1, 90,3 г, 164,9 г теоретический, 54,8%) в виде белого твердого вещества. Для 1: ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,8 (уш. с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,62 (с, 1H), 1,23 (с, 12H) м.д.; C₉H₁₅BN₂O₂ (Мол.масса, 194.04), ВЖМС (EI) m/e 195 (M⁺+H).

Пример 6. Альтернативный синтез 4-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола.

Схема VI



4-Бромпиразол (22). Пиразол (19, 34,0 г, 0,5 моль) и NBS (89,0 г, 0,5 моль, 1,0 экв) были суспендированы в воде (625 мл) при температуре окружающей среды. Полученную суспензию перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. Затем реакционную смесь экстрагировали EtOAc (2×100 мл). Объединенные экстракты EtOAc промывали водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и насыщенным раствором соли, сушили над Na_2SO_4 , и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного 4-бромпиразола (72,0 г, 73,5 г теоретический, выход 98%) в виде белого твердого вещества (чистота по ГХ: >98%), которое непосредственно использовали в последующей реакции без дополнительной очистки.

4-Бром-1-(этоксипиразол) (23). К раствору 4-бромпиразола (70,0 г, 0,476 моль) в CH_2Cl_2 (600 мл) был добавлен раствор 3,1 М HCl в диоксане (4 мл) и этилвиниловый эфир (41 г, 0,569 моль, 1,2 экв) при температуре окружающей среды. Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 ч. Реакционную смесь гасили водным раствором NaHCO_3 и два слоя разделились. Органический слой промывали водой, сушили над Na_2SO_4 , и концентрировали при пониженном давлении досуха с получением 4-бром-1-(этоксипиразол) (113 г, 104,3 г теоретический, 97% выход) в виде масла (чистота по ГХ: 89%), которое непосредственно использовали в последующей реакции без дополнительной очистки.

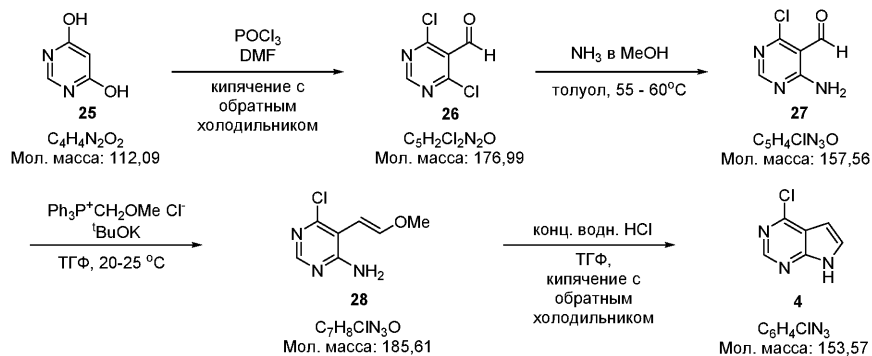
1-(Этоксипиразол)-4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (24). К 100 мл раствора $i\text{PrMgCl}\cdot\text{LiCl}$ (50 ммоль, 1,8 экв) в ТГФ было добавлено 4-бром-1-(этоксипиразол) (6,15 г, 28 ммоль) при температуре окружающей среды. Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды 12 часов, затем охлаждали до -20°C . Метоксипинаколюорат (10,6 г, 67 ммоль, 2,4 экв) был добавлен к реакционной смеси при -20°C . Полученная смесь перемешивалась при $0-10^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Водный раствор NH_4Cl был добавлен, чтобы погасить реакцию. Смесь затем экстрагировали петролейным эфиром (ПЭ). Объединенные экстракты ПЭ промывали насыщенным NaHCO_3 , сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт кристаллизовали из ПЭ с получением 1-(этоксипиразол)-4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола (24, 4,2 г, 7,45 г теоретический, 56,4% выход) в виде белого желтоватого цвета твердого вещества (чистота ГХ: 99%). Для 24: ^1H ЯМР (DMCO- d_6 , 400 МГц) 8,09 (с, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,62 (с, 1H), 5,55 (кв, 1H, J=6,1 Гц), 3,37 (уш. кв., 1H, J=7,1, 9,6 Гц), 3,12 (уш. кв, 1H, J=7,0, 9,7 Гц), 1,56 (д, 3H, J=6,0 Гц), 1,24 (с, 12H), 1,00 (т, 3H, J=7,0 Гц) м.д.; $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{BN}_2\text{O}_3$ (Мол. масса, 266,14), ВЖМС (EI) m/e 267 (M^+H).

4-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (1). К смеси 2,3-диметилбутан-2,3-диола (25,0 кг, 211,6 моль) и 1-(1-этоксипиразол)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола (24, 55,0 кг, 206,7 моль) в 1,2-дихлорэтаноле (750 кг) был медленно добавлен раствор HCl в МТВЕ (25,0 кг, 20-30% HCl) при $0-5^\circ\text{C}$. Полученная реакционная смесь перемешивалась при $10-20^\circ\text{C}$ в течение 3-5 ч. После того, как селективное снятие защиты было завершено, что контролировалось ВЭЖХ (1: ниже 1%), реакционную смесь дегазировали и наполняли азотом, затем охлаждали до -15°C . Затем в охлажденную реакционную смесь добавляли триэтиламин (TEA, 30,0 кг, 296,5 моль), доводя до pH 7-8. Смесь затем постепенно нагревали до температуры окружающей среды перед тем, как обработать водой (150 кг). Две фазы разделяли и органический слой промывали насыщенным раствором соли (60 кг) и сушили над сульфатом натрия (Na_2SO_4). Осушающий реагент, сульфат натрия (Na_2SO_4), удаляли фильтрованием и полученный раствор концентрировали при пониженном давлении при $40-50^\circ\text{C}$ до густого масла. Остаток нагревали до $60-70^\circ\text{C}$ и разбавляли петролейным эфиром (100 кг) при той же температуре. Полученную смесь затем постепенно охлаждали до комнатной температуры, а затем до -5°C и перемешивали при той же температуре в течение 3 ч. Твердые вещества собирали центрифугированием и высушивали при $50-60^\circ\text{C}$ под вакуумом с получением неочищенного желаемого продукта (1, 33,75 кг, 40,11 кг теоретический, 84,1%). Затем неочищенный целевой продукт суспендировали в 1,2-дихлорэтаноле (30 кг) и полученную смесь нагревали с обратным холодильником с получением прозрачного раствора. Затем к горячему раствору добавляли петролейный эфир (150 кг) при той же температуре. Полученную смесь затем постепенно охлаждают до комнатной температуры, а затем до -5°C и перемешивали при той

же температуре в течение 3 ч. Твердые вещества собирали путем центрифугирования и сушили под вакуумом при 50-60°C с получением 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пирозола (1, 31,0 кг, 40,11 кг теоретический, 77,3%) в виде не совсем белого твердого вещества, которое идентично во всех сопоставимых аспектах материалу, синтезированному при применении способа синтеза, как описано выше в примере 5.

Пример 7. Синтез 4-хлор-7Н-[пирроло[2,3-d]пиримидина.

Схема VII



4,6-Дихлорпиримидин-5-карбальдегид (26). В 5 л 4-горлую колбу, оснащенную механической мешалкой, капельной воронкой, конденсатором, термопарой, и N_2 развертки в водный промывной раствор NaOH, загружали и охлаждали на ледяной солевой бане оксихлоридфосфора ($POCl_3$, 1 л, 10,572 моль, 4,82 экв). N,N-Диметилформамид (ДМФА, 320 мл, 4,138 моль, 1,85 экв) по каплям добавляли в колбу при $0 \pm 2^\circ C$. После добавления приблизительно 100 мл ДМФА в течение около 0,5 ч, кристаллизация произошла, и температура реакции была увеличена от 0 до $10^\circ C$. Добавление прекращали и смесь оставляли для повторного охлаждения приблизительно до $2^\circ C$. Остаточное количество ДМФА добавляли в течение 2,5 ч при температуре ниже $8^\circ C$. Суспензия стала очень густой, затрудняя перемешивание. Когда добавление ДМФА было завершено, смесь перемешивали при $3-5^\circ C$ в течение 0,5 ч. 4,6-Дигидрокси-пиримидин (250 г, 2,232 моль) добавляли порционно в виде твердого вещества. После добавления около одной трети 4,6-дигидрокси-пиримидина реакционная смесь стала более разжиженной и наблюдался медленный экзотермический процесс с возрастанием температуры реакции приблизительно до $12^\circ C$ в течение 0,5 ч. Остаточное количество 4,6-дигидрокси-пиримидина порциями добавляли в течение 0,25 ч с увеличением температуры реакции от 12 до $27^\circ C$. Температура реакции поддерживалась на уровне $25-27^\circ C$ с переменным охлаждением во время которого желтая суспензия становилась более жидкой, а затем вновь густой. После прекращения экзотермического процесса околочез 1 ч, реакционную смесь медленно нагревали. Около $55^\circ C$ реакционная смесь стала очень густой и наблюдался второй умеренный экзотермический процесс. Нагревательная калильная сетка была снята в то время как температура реакции продолжала расти около до $63^\circ C$ и оставалась при этой температуре в течение нескольких минут перед тем как упасть. Нагревание смеси было возобновлено до достижения слабого кипения (около $100^\circ C$). При около $95^\circ C$, происходило постоянное довольно быстрое выделение газа HCl и реакционная смесь постепенно становилась разжиженной и затемненной. После около 0,5 ч, прозрачный коричневый раствор был получен, когда температура нагревания медленно возрастала до $115^\circ C$ в течение 1,25 ч. В общей сложности после 2,5 ч при кипячении с обратным холодильником, реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды. Избыточное количество $POCl_3$ (так много, насколько возможно) удаляли при пониженном давлении (температура бани $45-50^\circ C$). Остаточное густое коричневое масло выливали очень медленно в холодную H_2O (5 л) в 20 л делительной воронке, добавляя лед, что необходимо для поддержания водной смеси около температуры окружающей среды. Затем водную смесь экстрагировали EtOAc (2×3 л с последующим 1×2 л). Объединенные EtOAc экстракты промывали H_2O ($2 \times 2,5$ л), насыщенным $NaHCO_3$ водным раствором (1 л), концентрированным соевым раствором (1 л), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении (температура бани при температуре $35^\circ C$) с получением неочищенного 4,6-дихлорпиримидин-5-карбальдегида (270 г, 395 г теоретический, 68,4%) в виде желто-оранжевого твердого вещества. Навеску 20 г этого сырого материала очищали с помощью дистилляции Кугельрора (температура печи при $90-100^\circ C$, 225 мТорр), что дало 15,3 г чистого 4,6-дихлорпиримидин-5-карбальдегида в виде белого твердого вещества, которое становилось желтым при хранении при температуре окружающей среды. 1H ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$) 10,46 (с, 1H), 8,89 (с, 1H) м.д.

4-Амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегид (27). Раствор 7 M NH_3 в MeOH (265 мл, 1,855 моль, 2,0 экв) добавляли в течение 1,25 ч к раствору 4,6-дихлорпиримидин-5-карбальдегида (163,7 г, 0,9301 моль) в толуоле (3 л) при температуре окружающей среды. Температура реакционной смеси постепенно возрастала от 20 до $26^\circ C$ и образовывалась желтая суспензия. Применялось легкое охлаждение для поддержания температуры реакционной смеси ниже $26^\circ C$. Суспензия перемешивалась при температуре окружающей среды в течение 3,5 ч перед отделением твердых веществ фильтрованием. Твердые вещества

промывали EtOAc (1 л). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, и твердые вещества растирали с толуолом и н-гептаном (2:1 об/об, 600 мл), фильтровали и сушили с получением 71,1 г 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегида в виде желтого твердого вещества. Исходное твердое вещество отфильтровывали из реакционной смеси, которая содержала дополнительное количество 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегида. Продукт экстрагировали из отфильтрованного твердого вещества перемешиванием в EtOAc (1,25 л) в течение 1,5 ч, фильтровали, затем перемешивали в ТГФ (750 мл) в течение 1 ч и снова фильтровали. Оба EtOAc и ТГФ фильтрата концентрировали при пониженном давлении и полученные твердые вещества растирали с толуолом и н-гептаном (2:1 об/об, 450 мл), фильтровали и сушили с получением дополнительных 44,1 г 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегида в виде желтого твердого вещества. Общий выход 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегида (115,2 г, 146,5 г теоретический) был 78,6%. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,23 (с, 1H), 8,71 (уш. с, 1H), 8,55 (уш. с, 1H), 8,39 (с, 1H) м.д., $\text{C}_5\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}$ (Мол. масса, 157,56), ВЖМС (EI) m/e 158 (M^+H).

6-Хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламин (28). Суспензия (метоксиметил)трифенилфосфоний хлорида (276,0 г, 0,807 моль, 1,1 экв) в ТГФ (1.5 л) была охлаждена в ледяной солевой бане до -2°C и 1 M трет-бутоксид калия (KO^tBu) в ТГФ (807 мл, 0.807 моль, 1.1 экв) добавляли в течение 1,5 ч при -2 до -3°C . Темно красно-оранжевую смесь перемешивали при -2 до -3°C в течение 1 ч. 4-Амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегид (115,2 г, 0,7338 моль, 1,0 экв) затем порционно добавляли к реакционной смеси в качестве твердого вещества с применением ТГФ (200 мл) для промывки контейнера и делительной воронки. Во время добавления, температура реакционной смеси возрастала от -3 до 13°C и цвет изменялся на коричневый. Когда температура реакционной смеси упала до 10°C , охлаждающую баню сняли и позволили реакционной смеси нагреться до комнатной температуры и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 42 ч. Реакционная смесь была охлаждена до -2°C перед гашением медленным добавлением насыщенного водного раствора NH_4Cl (750 мл). Смесь концентрировали при пониженном давлении, чтобы удалить большую часть ТГФ. Остаток распределяли между EtOAc (3 л) и H_2O (1 л). Органическую фазу фильтровали для удаления нерастворимого материала на границе раздела, затем экстрагировали 2 н. HCl (4×250 мл), затем 3 н. HCl (2×250 мл). Объединенные экстракты HCl вновь экстрагировали этилацетатом (500 мл), затем фильтровали через целит, чтобы удалить нерастворимый материал. Фильтрат охлаждали на ледяной солевой бане, доводили до pH 8 с помощью 6 н. водного раствора NaOH и экстрагировали EtOAc (3×1 л). Объединенные экстракты EtOAc промывали насыщенным раствором соли (1 л), сушили над Na_2SO_4 , перемешивали с активированным углем (10 г) и силикагелем (10 г) в течение 1 ч. Смесь фильтровали через целит, промывая целит этилацетатом (1 л). Фильтрат концентрировали, совместно испаряя остаточный EtOAc с н-гептаном (500 мл). Полученное бурое твердое вещество выкачивали под высоким вакуумом в течение 2 ч с получением неочищенного 6-хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламина (72,3 г, 136,2 г теоретический, 53,1%). Сырой требуемый продукт был использован в следующей реакции без дополнительной очистки. Образец сырого продукта (2,3 г) очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с элюированием смесью 0-35% EtOAc/н-гептан с получением 1,7 г чистого 6-хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламина в виде белого твердого вещества, которое было смесью от 1 до 2 E/Z изомеров. ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) для E-изомера: δ 8,02 (с, 1H), 7,08 (уш. с, 2H), 6,92 (д, 1H, $J=13.1$), 5,35 (д, 1H, $J=13,0$ Гц), 3,68 (с, 3H) м.д. и для Z-изомера: δ 8,06 (с, 1H), 7,08 (уш.с, 2H), 6,37 (д, 1H, $J=6,8$ Гц), 5,02 (д, 1H, $J=6,7$ Гц), 3,69 (с, 3H) м.д.; $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}$ (Мол.масса, 185,61), ВЖМС (EI) m/e 186/188 (M^+H).

4-Хлор-7Н-[пирроло[2,3-d]пиримидин (4). Концентрированную HCl (5 мл) добавляли к раствору сырого 6-хлор-5-(2-метоксивинил) пиримидин-4-иламина (70,0 г, 0,3784 моль) в ТГФ (700 мл) и полученную реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 7,5 ч. При нагреве сформировалась не густая суспензия, которая постепенно повторно растворялась. Когда реакция была завершена, что подтвердил контроль ВЭЖХ, реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи.

Твердый NaHCO_3 (15 г) был добавлен к реакционной смеси и полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Активированный уголь (7 г), силикагель (7 г) и Na_2SO_4 (20 г) были добавлены к смеси и нагревали до 40°C в течение 1 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит, промывая целит с ТГФ (1 л). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и полученное твердое вещество сушили при пониженном давлении с получением неочищенного 4-хлор-7Н-[пирроло[2,3-d]пиримидина (4, 58,1 г, 58,1 г теоретический, 100%) в виде желто-коричневого твердого вещества. Этот неочищенный целевой продукт растворяли в EtOAc (1 л) при $50-55^\circ\text{C}$ и обрабатывали активированным углем (3 г). Смесь фильтровали через целит при нагревании и слой целита промывали теплой EtOAc (250 мл). Фильтрат концентрировали до около 500 мл, и суспензию выдерживали при температуре окружающей среды в течение ночи. Суспензию затем охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$ в течение 2 ч перед тем как собрать твердые вещества фильтрацией. Твердые вещества сушили с получением чистого 4-хлор-7Н-[пирроло[2,3-d] пиримидина (4, 54,5 г, 58,1 г теоретический, 94%) в виде желто-коричневых кристаллов. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 12,58 (уш. с, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,69 (д, 1H, $J=3.5$ Гц), 6,59 (д, 1H, $J=3.5$ Гц) м.д.; ВЖМС (EI) m/e 154/156 (M^+H).

Пример А: In vitro анализ JAK Киназы.

Соединение формулы I испытывали на ингибирующую активность в отношении JAK объектов, согласно следующему in vitro анализу, описанному в Park et al., *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104. Каталитические домены человеческого JAK1 (a.a. 837-1142) и JAK2 (a.a. 828-1132) с N-концевыми метками были экспрессированы с помощью бакуловируса в клетках насекомых и очищены. Каталитическую активность JAK1 и JAK2 анализировали путем измерения фосфорилирования биотинилированного пептида.

Фосфорилированный пептид был обнаружен по однородной с временным разделением флуоресценции (HTRF). IC₅₀ соединений были измерены для каждой киназы в 40 мкл реакций, которые содержали фермент, АТФ и 500 нМ пептид в 50 мМ Трис (рН 7,8) буфер с 100 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ и 0.1 мг/мл (0.01%) БСА. Для 1 мМ IC₅₀ измерений, концентрация АТФ в реакциях составляла 1 мМ. Реакции проводили при температуре окружающей среды в течение 1 ч, а затем останавливали 20 мкл 45 мМ ЭДТА, 300 нМ SA-APC, 6 нМ Eu-Py20 в буфере для анализа (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts). Связывание с меченым европием антителом проходило в течение 40 мин и HTRF сигнала измеряли на счетчике Fusion пластины (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts). Соединение Формулы I и соль адипиновой кислоты имела IC₅₀ в JAK1 от ≤5 нМ (измерены при 1 мМ АТФ) при соотношении JAK2/JAK1>10 (измерены при 1 мМ АТФ).

Пример В: Клеточные исследования.

Линии раковых клеток, зависящие от цитокинов и, следовательно, JAK/STAT передачи сигналов, для роста, высевали при 6000 клеток на лунку (формат 96-луночного планшета) в среде RPMI 1640, 10% FBS, и 1 нг/мл соответствующего цитокина. Соединение может быть добавлено к клеткам в ДМСО/носителя (конечная концентрация ДМСО 0,2%), и инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Влияние соединения на жизнеспособность клеток оценивали с помощью CellTiter-Glo люминесцентной ячейки Анализ жизнеспособности клеток (Promega) с последующим TopCount (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts) количественным определением. Потенциальные нецелевые эффекты соединений измерены в параллели, используя не-JAK, которые ведут клеточную линию с тем же самым анализом считывания. Все эксперименты, как правило, выполняли в двух повторах.

Упомянутые выше линии клеток могут также использоваться для исследования воздействия соединений на фосфорилирование JAK киназ или потенциальных субстратов ниже в биохимическом пути, таких как белки STAT, Akt, Shp2 или Erk. Эти эксперименты могут выполняться на протяжении ночи при голодании цитокина, с последующей короткой предварительной инкубацией с соединением (2 ч или менее) и цитокиновой стимуляцией в течение около 1 ч или менее. Затем белки экстрагировали из клеток и анализировали методами, знакомыми специалистам в данной области техники, включая вестерн-блоттинг или ТИФА с применением антител, которые могут дифференцировать между фосфорилированным и общим белком. В указанных экспериментах могут применяться нормальные или раковые клетки, чтобы исследовать воздействие соединений на биологию выживания клетки опухоли или на медиаторы воспалительного заболевания. Например, относительно последнего, цитокины, такие как IL-6, IL-12, IL-23 или IFN, могут использоваться для стимулирования активации JAK, что ведет к фосфорилированию белка(ов) STAT и потенциально к транскрипционным профилям (которые оценивают методом массива или технологией кПЦР) или выработке и/или секреции белков, таких как IL-17. Способность соединений подавлять эти опосредованные цитокином эффекты может быть измерена с использованием методов, широко известных специалистам в данной области техники.

Соединения по данному изобретению дополнительно могут быть протестированы на клеточных моделях, разработанных с целью оценки их эффективности и активности против мутантных JAK, например, с мутацией JAK2V617F, найденной при миелоидных пролиферативных расстройствах. В таких экспериментах часто применяют цитокин-зависимые клетки гематологической клеточной линии (например BaF/3) в которой эктопически экспрессируются JAK киназы дикого типа или мутантные (James, C., et al. *Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC* 280:41893-41899). Конечные точки включают воздействие соединений на выживание, пролиферацию клеток и фосфорилированные белки JAK, STAT, Akt или Erk.

Некоторые соединения по данному изобретению могут быть оценены относительно их активности подавления пролиферации Т-клеток. В качестве такого анализа может рассматриваться анализ запускаемой вторым цитокином (т.е. JAK) пролиферации, а также упрощенный анализ иммуносупрессии или ингибирования иммунной активации. Ниже приведен короткий очерк того, каким образом могут выполняться данные эксперименты. Моноядерные клетки периферической крови (МКПК) получают из образцов цельной крови человека с применением способа отделения Ficoll Нураque, и Т-клетки (фракция 2000) могут быть получены из МКПК сцеживанием. Свежевыделенные Т-клетки человека могут содержаться в питательной среде (RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) с плотностью 2×10⁶ клеток/мл при температуре 37°C до 2 дней. Для анализа стимулированной IL-2 пролиферации клетки, Т-клетки вначале обрабатывают фитогемагглютинином (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 72 ч. После однократного промывания ФСБ 6000 клеток/лунку наносят на 96-луночные планшеты и обрабатывают соединениями в различных концентрациях в питательной среде в присутствии 100 Ед/мл IL-2 человека (ProSpec-Tany TechnoGene;

Rehovot, Израиль). Планшеты инкубируют при 37°C в течение 72 ч, и индекс пролиферации оценивают с применением люминесцентных реактивов CellTiter-Glo, следуя предложенному производителем протоколу (Promega; Madison, Wisconsin).

Пример С. *In vivo* Противоопухолевая эффективность.

Соединения по данному изобретению могут быть оценены на моделях ксенотрансплантата опухоли человека у мышей с ослабленным иммунитетом. Например, канцерогенный вариант линии клеток плазмацитомы INA-6 могут применять для подкожной инокуляции мышам SCID (Burger, R., et al. *Hematol J.* 2:42-53, 2001). В дальнейшем несущие опухоль животные могут быть рандомизированы в группы лечения лекарственным средством или растворителем, и различные дозы соединений могут быть введены любым количеством обычных способов, включая пероральный, внутрибрюшинный или непрерывную инфузию с применением имплантируемых насосов. Рост опухоли отслеживают во времени с помощью штангенциркуля. В дальнейшем образцы опухоли могут быть отобраны для анализа в любое время после начала лечения, как изложено выше (пример В), чтобы оценить влияние соединения на активность JAK и нижележащих путей проведения сигнала. Дополнительно, селективность соединения(ий) может быть оценена с применением моделей ксенотрансплантата опухоли, которые запускаются другими, известными киназами (например Vcr-Abl), таких как модель опухоли K562.

Пример D. Тест кожной реакции контактной гиперчувствительности по замедленному типу у мышей.

Соединения по данному изобретению дополнительно могут быть протестированы относительно их эффективности (ингибирование мишеней JAK) на тестовой модели запускаемой Т-клетками замедленной гиперчувствительности у мышей. Кожная реакция контактной гиперчувствительности по замедленному типу (ГЗТ) у мышей считается годной моделью клинического контактного дерматита и других опосредованных Т-лимфоцитами иммунных расстройств кожи, таких как псориаз (*Immunol Today.* 1998 Jan;19(1):37-44). Многочисленные характеристики объединяют ГЗТ у мышей с псориазом, в том числе, иммунный инфильтрат, сопутствующее повышение уровня воспалительных цитокинов и гиперпролиферация кератиноцитов. Кроме того, многие классы агентов, эффективных при лечении псориаза в клинике, также являются эффективными ингибиторами реакции ГЗТ у мышей (*Agents Actions.* 1993 Jan;38(1-2):116-21).

В 0-й и 1-й дни мышей Balb/c сенсibilizировали местным нанесением на выбритое брюхо антигена 2,4-динитро-фторбензола (ДНФБ). На 5-й день измеряли толщину ушей с помощью инженерного микрометра. Результаты измерения регистрировали и применяли в качестве начального уровня. Затем оба уха животных нагружали местным нанесением ДНФБ в общей дозе 20 мкл (10 мкл на внутреннюю часть и 10 мкл на внешнюю часть ушной раковины) с концентрацией 0,2%. Через 24-72 ч после нагрузки уши снова измеряли. Лечение тестовыми соединениями проводили в течение фаз сенсibilизации и нагрузки (с дня -1 до дня 7) или до и в течение фазы нагрузки (обычно начиная со второй половины дня 4 до дня 7). Лечение тестовыми соединениями (в разных концентрациях) проводили системно или местно (местное нанесение лекарственного средства на уши). На эффективность исследуемых соединений указывало уменьшение припухлости уха, по сравнению с отсутствием лечения. Соединения, вызывающие уменьшение на 20% или более, считаются эффективными. В некоторых экспериментах мышам нагружали без сенсibilизации (отрицательный контроль).

Ингибирующий эффект (подавление активации путей JAK-STAT) исследуемых соединений может быть подтвержден иммуногистохимическим анализом. Активация пути(ей) JAK-STAT приводит к образованию и транслокации функциональных факторов транскрипции. В дальнейшем, приток иммунных клеток и увеличенная пролиферация кератиноцитов также должны обеспечивать уникальные изменения профиля экспрессии в ухе, которые могут быть исследованы и определены количественно. Фиксированные в формалине и залитые парафином срезы уха (образцы отобраны после фазы нагрузки в модели ГЗТ) подвергают иммуногистохимическому анализу с применением антитела, которое специфично взаимодействует с фосфорилированным STAT3 (клон 58E12, Cell Signaling Technologies). Уши мыши обрабатывают исследуемыми соединениями, растворителем или дексаметазоном (клинически эффективное лечение для псориаза), или оставляют без лечения в модели ГЗТ для сравнения. Исследуемые соединения и дексаметазон могут продуцировать сходные транскрипционные изменения как качественно, так и количественно, а также исследуемые соединения и дексаметазон могут уменьшать количество инфильтрующих клеток. Системное и местное применение исследуемых соединений может вызывать ингибирующий эффект, т.е. уменьшение количества инфильтрующих клеток и ингибирование транскрипционных изменений.

Пример E. *In vivo* противовоспалительная активность.

Соединения по данному изобретению могут быть оценены на моделях грызунов или не грызунов, разработанных для воспроизведения единичной или комплексной реакции воспаления. Например, модели артрита у грызунов могут применяться для оценки терапевтического потенциала соединений, вводимых превентивно или терапевтически. Эти модели включают, без ограничений, индуцированный коллагеном артрит у мышей или крыс, индуцированный адьювантом артрит у крыс и артрит, индуцированный антителом к коллагену. Кроме того, аутоиммунные заболевания, в том числе, без ограничений, рассеян-

ный склероз, сахарный диабет I типа, увеоретинит, тиреоидит, миастения, иммуноглобулиновые нефропатии, миокардиты, сенсбилизация дыхательных путей (астма), волчанка или колит, могут использоваться для оценки терапевтического потенциала соединений по данному изобретению.

Эти модели хорошо изучены в сообществе исследователей и знакомы специалистам в данной области техники (Current Protocols in Immunology, Vol 3., Coligan, J.E. et al., Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. и Willoughby, D.A., Humana Press, 2003).

Пример F. Животные модели для лечения сухости глаз, увеита и конъюнктивита.

Агенты могут быть оценены на одной или более доклинических моделях сухости глаз, известных специалистам в данной области техники, в том числе, без ограничения, модель с применением конканавалина А (ConA) на слезной железе кролика, скополаминовая модель (подкожная или трансдермальная) на мышах, модель на слезной железе мыши с применением ботулотоксина или любая из целого ряда спонтанных аутоиммунных моделей у грызунов, которые приводят к дисфункции глазной железы (например NOD-SCID, MRL/lpr или NZB/NZW) (Barabino et al., Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 и Schrader et al., Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Конечные точки в этих моделях могут включать гистопатологию глазных желез и глаза (роговая оболочка и т.п.), а также классическую пробу Ширмера или ее модифицированные версии (Barabino et al.), в которых измеряют выработку слезной жидкости. Активность оценивают при ведении доз несколькими способами (например, системно или местно), которое может начинаться до или после появления измеримого заболевания.

Агенты могут быть оценены на одной или более доклинических моделях увеита, известных специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничения, модели экспериментального аутоиммунного увеита (ЭАУ) и индуцированного эндотоксином увеита (ИЭУ). Эксперименты ЭАУ могут быть выполнены на кролике, крысе или мыши, и могут включать пассивную или активную иммунизацию. Например, любой из множества антигенов сетчатки может применяться для сенсбилизации изобретения животных к соответствующему иммуногенному средству, после чего глаза животных могут быть нагружены тем же антигеном. Модель ИЭУ является более острой и включает местное или системное введение липополисахаридов в сублентальных дозах. Конечные точки моделей ИЭУ и ЭАУ могут включать, среди прочего, фундоскопическое обследование и гистопатологию. Эти модели рассмотрены Smith et al. (Immunology and Cell Biology 1998, 76, 497-512, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Активность оценивают при ведении доз несколькими способами (например, системно или местно), которое может начинаться до или после появления измеримого заболевания. Кроме того, в некоторых моделях, перечисленных выше, может развиваться склерит/эписклерит, хориоидит, циклит или воспаление радужной оболочки глаза, и, таким образом, они являются пригодными для исследования потенциальной активности соединений для терапевтического лечения указанных заболеваний.

Дополнительно, агенты могут быть оценены в одной или более доклинических моделях конъюнктивита, известных специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничения, модели на грызунах с применением морской свинки, крысы или мыши. Модели на морской свинке включают модели с применением активной или пассивной иммунизации и/или иммунных протоколов нагрузки антигенами, такими как яичный белок или амброзия (рассмотрены в Groneberg, D.A., et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Модели на крысе и мыши по общему дизайну сходны с моделями на морской свинке (также рассмотрены Groneberg). Активность оценивают при ведении доз несколькими способами (например, системно или местно), которое может начинаться до или после появления измеримого заболевания. Конечные точки для такого исследования могут включать, например, гистологический, иммунологический, биохимический или молекулярный анализ глазных тканей, таких как конъюнктива.

Пример G. In vivo защита кости.

Соединения могут быть оценены на различных доклинических моделях остеопении, остеопороза или резорбции кости, известных специалистам в данной области техники. Например, грызуны с удаленными яичниками могут быть использованы для оценки способности соединений воздействовать на признаки и маркеры ремоделирования и/или плотности кости (W.S.S. Jee и W. Yao, J Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 1(3), 193-207, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Альтернативно, плотность и архитектура кости могут быть оценены в контроле или леченных соединением грызунах на моделях индуцированной лечением (например, глюкокортикоидом) остеопении (Yao, et al. Arthritis and Rheumatism, 2008, 58(6), 3485-3497; и там же 58(11), 1674-1686; обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Кроме того, влияние соединений на резорбцию и плотность кости может поддаваться оценке на моделях артрита у грызунов, обсуждавшихся выше (пример E). Конечные точки для всех указанных моделей могут варьировать, но часто включают гистологическую и радиологическую оценку, а также иммуногистологию и подходящие биохимические маркеры ремоделирования кости.

Ряд вариантов реализации изобретения были описаны. Тем не менее, следует понимать, что различные модификации могут быть выполнены без отступления от сущности и объема данного изобретения. Соответственно, другие варианты реализации изобретения находятся в пределах объема прилагаемой

из соединения формулы VIII.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором взаимодействие соединения формулы VIII с соединением формулы IXa:

(a) проводят в компоненте растворителя, содержащего ацетонитрил; и

(b) проводят в компоненте растворителя, содержащего ацетонитрил, при температуре от 40 до 60°C.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором используют от 1 до 1,2 эквивалента соединения формулы IXa исходя из соединения формулы VIII.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором катализатор реакции сочетания Сузуки представляет собой тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0).

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором основание представляет собой бикарбонат натрия.

8. Способ по п.7, в котором бикарбонат натрия присутствует в количестве 4 или более эквивалентов исходя из соединения формулы VIIa.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором второй компонент растворителя содержит 1,4-диоксан и воду.

10. Способ по п.9, в котором 1,4-диоксан и вода присутствуют в объемном соотношении 1:1.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором соединения формул VIIa и IVa присутствуют в молярном соотношении 1:1.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором условия реакции сочетания Сузуки включают нагревание реакционной смеси, содержащей соединение формулы VIIa, соединение формулы IVa, тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0), бикарбонат натрия и второй компонент растворителя, и где второй компонент растворителя включает воду и 1,4-диоксан.

