

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047869

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.23

(51) Int. Cl. C07D 401/04 (2006.01)
C07D 213/61 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290361

(22) Дата подачи заявки
2019.01.29

(54) СПОСОБЫ И ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРА
JAK

(31) 62/623,664

(32) 2018.01.30

(33) US

(43) 2022.04.13

(62) 202091830; 2019.01.29

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

(72) Изобретатель:
Ван Дэнцинь, Лю Пинли, У Юнчжун,
Чжоу Цзячэн (US)

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

(56) WO-A1-2011112662

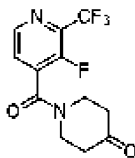
SHEN H.C. ET AL.: "A strategy of
employing aminoheterocycles as amide mimics to
identify novel, potent and bioavailable soluble
epoxide hydrolase inhibitors", BIOORGANIC &
MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 19, no.
19, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 5716-5721,
XP026624072, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/
J.BMCL.2009.08.006, page 5721, Scheme 1

WO-A1-2014138168

WO-A1-2013036611

WO-A1-9724324

(57) Изобретение относится к способу получения соединения формулы V, промежуточному соединению для получения {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, пригодного при лечении заболеваний, связанных с активностью янус-киназ (JAK), включая воспалительные расстройства, аутоиммунные расстройства, рак и другие заболевания.



V

B1

047869

047869

B1

Область техники

Данное изобретение относится к способам и промежуточным соединениям для получения {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил]пиперидин-4-ил}-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]азетидин-3-ил}ацетонитрила, полезного при лечении заболеваний, связанных с активностью янус-киназ (JAK), включая воспалительные расстройства, аутоиммунные расстройства, рак и другие заболевания.

Уровень техники

Протеинкиназы (PK) регулируют различные биологические процессы, включая клеточный рост, выживание, дифференциацию, формирование органов, морфогенез, неоваскуляризацию, восстановление тканей и регенерацию, среди прочего. Протеинкиназы также играют специализированные роли в большом количестве заболеваний людей, включая рак. Цитокины, полипептиды или гликопротеины малой молекулярной массы, регулируют множество путей, включенных в воспалительную реакцию хозяина на сепсис. Цитокины влияют на клеточную дифференциацию, пролиферацию и активацию и могут модулировать как провоспалительные, так и противовоспалительные реакции, чтобы позволить хозяину адекватно реагировать на патогены. Передача сигналов широким спектром цитокинов включает семейство янус-киназ (JAK), протеин-тирозинкиназы и переносчики сигнала и активаторы транскрипции (STAT). Есть четыре известных JAK млекопитающих: JAK1 (янус-киназа-1), JAK2, JAK3 (также известная как янус-киназа, лейкоцит; JAKL и L-JAK) и TYK2 (протеин-тирозинкиназа 2).

Цитокин-стимулированные иммунная и воспалительная реакции способствуют патогенезу заболеваний: патологии, такие как тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID), возникают в результате подавления иммунной системы, в то время как гиперактивный или нефизиологический иммунный/воспалительный ответ способствует патологии аутоиммунных заболеваний (например, астма, системная красная волчанка, тиреоидит, миокардит) и заболеваний, таких как склеродермия и остеоартрит (Ortmann, R.A., T. Cheng, et al. (2000), *Arthritis Res.* 2(1):16-32).

Изъяны в экспрессии JAK связаны со многими болезненными состояниями. Например, Jak1-/- мыши, маломерные при рождении, не питаются и умирают внутриутробно (Rodig, S.J., M.A. Meraz, et al. (1998), *Cell*, 93(3):373-83). Jak2-/- эмбрионы мышей анемичны и умирают около на 12,5 день после коитуса из-за отсутствия окончательного эритропоэза.

Путь JAK/STAT, и, в частности, все четыре JAK, как полагается, играют определенную роль в патогенезе астматического ответа, хронической обструктивной болезни легких, бронхита и других родственных воспалительных заболеваний нижних отделов дыхательных путей. Множество цитокинов, которые передают сигналы через

JAK, были связаны с воспалительными заболеваниями/состояниями верхних дыхательных путей, такими как те, которые влияют на нос и пазухи (например, ринит и синусит), будь то классические аллергические реакции, или нет. Путь JAK/STAT также участвует в воспалительных заболеваниях/состояниях глаз и хронических аллергических реакциях.

Активация JAK/STAT при раке может происходить за счет стимуляции цитокина (например, IL-6 или GM-CSF) или снижения эндогенных супрессоров передачи сигналов JAK, таких как SOCS (супрессоры цитокиновых сигналов) или PIAS (белок-ингибитор активированного STAT) (Boudny, V., and Kovarik, J., *Neoplasia*. 49:349-355, 2002). Активация передачи сигналов STAT, а также другие нисходящие пути JAK (например, Akt), коррелируют с плохим прогнозом для многих типов рака (Bowman, T., et al. *Oncogene* 19:2474-2488, 2000). Повышенные уровни циркулирующих цитокинов, которые передают сигналы через JAK/STAT, играют причинную роль в кахексии и/или хронической усталости. Таким образом, ингибирование JAK может быть полезным для больных раком по причинам, которые выходят за пределы потенциальной противоопухолевой активности.

Тирозинкиназа JAK2 может быть полезной для пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, например, полицитемии вера (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ЕТ), миелоидной метаплазии с миелофиброзом (МММ) (Levin, et al, *Cancer Cell*, vol. 7, 2005, 387-397). Ингибирование киназы JAK2V617F уменьшает пролиферацию гемопоэтических клеток, что предполагает JAK2 в качестве потенциальной мишени для фармакологического ингибирования у пациентов с PV, ЕТ и МММ.

Ингибирование JAK может принести пользу пациентам, страдающим от кожных иммунных расстройств, таких как псориаз и повышение чувствительности кожи. Поддержание псориаза, как полагают, зависит от целого ряда воспалительных цитокинов в дополнение к различным хемокинам и факторам роста (JCI, 113:1664-1675), многие из которых передают сигналы через JAK (*Adv Pharmacol.* 2000; 47:113-74).

JAK1 играет ключевую роль в ряде сигнальных путей цитокинов и факторов роста, которые, при дерегуляции, могут привести или способствовать болезненным состояниям. Например, уровни IL-6 повышаются при ревматоидном артрите, заболевании, при котором предполагаются пагубные последствия (Fonesca, J.E. et al., *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009). Из-за передачи сигналов IL-6, по крайней мере частично, через JAK1, ожидается, что антагонизм IL-6 прямо или косвенно посредством ингибирования JAK1 обеспечит клиническое преимущество (Guschin, D.N., et al. *Embo J.* 14:1421, 1995; Smolen, J.S., et al. *Lancet*, 371:987, 2008). Кроме того, в некоторых видах рака JAK1 мутирует и приводит к конститу-

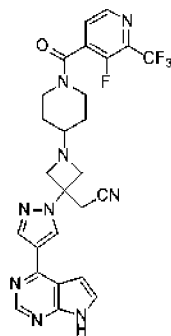
тивному росту и выживаемости нежелательных клеток опухоли (Mullighan C.G, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:9414-8, 2009; Flex E., et al. J. Exp. Med. 205:751-8, 2008). При других аутоиммунных заболеваниях и раке повышенные системные уровни воспалительных цитокинов, которые активируют JAK1, могут также способствовать заболеванию и/или сопутствующим симптомам. Таким образом, пациенты с такими заболеваниями могут получить пользу от ингибирования JAK1. Селективные ингибиторы JAK1 могут быть эффективными, избегая при этом ненужных и потенциально нежелательных эффектов ингибирования других JAK киназ.

Селективные ингибиторы JAK1 относительно других JAK киназ могут иметь несколько терапевтических преимуществ по сравнению с менее селективными ингибиторами. В отношении селективности к JAK2 ряд важных цитокинов и факторов роста передают сигналы через JAK2, в том числе, например, эритропоэтин (Еро) и тромбопоэтин (Тро) (Parganas E., et al. Cell. 93:385-95, 1998). Еро является ключевым фактором роста продуцирования красных кровяных телец; следовательно, нехватка Еро-зависимой передачи сигналов может привести к сокращению числа эритроцитов и анемии (Kaushansky K, NEJM, 354:2034-45, 2006). Тро, другой пример JAK2-зависимого фактора роста, играет ключевую роль в контроле пролиферации и созревания мегакариоцитов - клеток, из которых продуцируются тромбоциты (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Таким образом, снижение передачи сигналов Тро уменьшит число мегакариоцитов (мегакариоцитопения) и снизит количество циркулирующих тромбоцитов (тромбоцитопения). Это может привести к нежелательному и/или неконтролируемому кровотечению. Снижение ингибирования других JAK, таких как JAK3 и TYK2, также может быть желательным, так как люди, не имеющие функциональной версии данных киназ, как было показано, страдают от многочисленных недугов, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит или синдром гипериммуноглобулина Е (Minogishi, Y., et al. Immunity, 25:745-55, 2006; Macchi P., et al. Nature. 377:65-8, 1995). Таким образом, ингибитор JAK1 со сниженной аффинностью к другим JAK будет иметь существенные преимущества по сравнению с менее селективными ингибиторами по отношению к снижению побочных эффектов, связанных с иммунной супрессией, анемией и тромбоцитопенией.

Из-за полезности ингибиторов JAK существует необходимость в разработке новых способов получения ингибиторов JAK. Настоящее изобретение направлено на данную и другие задачи.

Сущность изобретения

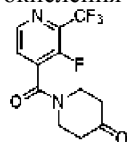
Ингибиторы JAK описаны в US 2011/0224190, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме, включая {1-{1-[3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил]пиперидин-4-ил}-3-[4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил]азетидин-3-ил}ацетонитрил, который изображен ниже как формула I:



I

В данном изобретении, в частности, предложены способы и промежуточные соединения для получения соединения формулы I.

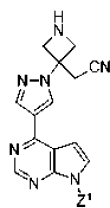
Способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать приведение в контакт соединения формулы IV или его соли в условиях окисления с образованием соединения формулы V:



V

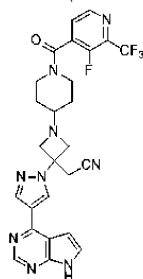
или его соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в данном документе, дополнительно включают приведение в контакт соединения формулы V с соединением формулы VI:



VI

или его солью в присутствии восстанавливающего агента, с образованием соединения формулы I:



I

или его соли;

где Z^1 представляет собой H или защитную группу.

Подробное описание сущности изобретения

Следует понимать, что определенные признаки данного изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов реализации, также могут быть предложены в комбинации в одном варианте реализации. И наоборот, различные признаки данного изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации, также могут быть предложены отдельно или в любой пригодной подкомбинации.

Способы, описанные в данном документе, можно контролировать любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, образование продукта можно контролировать с помощью спектроскопических средств, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, или спектрофотометрия (например, УФ в видимом диапазоне), или хроматография, такая как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ) или другие родственные методы.

Как используется в данном документе, термин "приведение в контакт" используется, как известно в данной области техники, и, как правило, относится к приведению в контакт химических реагентов таким образом, чтобы позволить их взаимодействие на молекулярном уровне для достижения химического или физического преобразования. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт включает два реагента, где используют один или более эквивалентов второго реагента по отношению к первому реагенту. Стадии способов приведения в контакт, описанные в данном документе, могут быть проведены в течение времени и в условиях, пригодных для получения идентифицированного продукта.

Получение соединений может включать защиту и снятие защиты с различных химических групп. Специалист в данной области техники может легко определить необходимость защиты и снятия защиты, а также выбор подходящих защитных групп. Химию защитных групп можно найти, например, в Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., Wiley & Sons, 2007, включенной в данное описание в полном объеме посредством ссылки. Изменения защитных групп и способов получения и расщепления, описанных в данном документе, могут быть выполнены по мере необходимости в зависимости от различных заместителей.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть проведены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители могут быть по существу нереакционноспособными по отношению к исходным веществам (реагентами), промежуточным продуктам или продуктам при температурах, при которых проводят реакции, например температурах, которые могут варьироваться от температуры замораживания растворителя до температуры кипения растворителя. Данную реакцию можно проводить в одном растворителе или смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции могут быть выбраны подходящие растворители для конкретной стадии реакции. В некоторых вариантах реализации изобретения реакции можно проводить в отсутствие растворителя, например, когда по меньшей мере один из реагентов представляет собой жидкость или газ.

Пригодные растворители могут включать галогенированные растворители, такие как четыреххлористый углерод, бромдихлорметан, дибромхлорметан, бромформ, хлороформ, бромхлорметан, дибромметан, бутил хлорид, дихлорметан, тетрачлорэтилен, трихлорэтилен, 1,1,1-трихлорэтан, 1,1,2-трихлорэтан, 1,1-дихлорэтан, 2-хлорпропан, α,α,α -трифтортолуол, 1,2-дихлорэтан, 1,2-дибромэтан, гексафторбензол, 1,2,4-трихлорбензол, 1,2-дихлорбензол, хлорбензол, фторбензол, их смеси и т.п.

Пригодные растворители-простые эфиры включают диметоксиметан, тетрагидрофуран, 1,3-диоксан, 1,4-диоксан, фуран, диэтиловый эфир, диметилвый эфир этиленгликоля, диэтиловый эфир этиленгликоля, диметилвый эфир диэтиленгликоля, диэтиловый эфир диэтиленгликоля, диметилвый эфир триэтиленгликоля, анизол, трет-бутилметилвый эфир, их смеси и т.п.

Пригодные 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- или 3-пентанол, неопентиловый спирт, трет-пентиловый спирт, монометилвый эфир диэтиленгликоля, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, циклогексанол, бензиловый спирт, фенол или глицерин.

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

Пригодные углеводородные растворители включают бензол, циклогексан, пентан, гексан, толуол, циклогептан, метилциклогексан, гептан, этилбензол, м-, о- или п-килол, октан, индан, нонан или нафталин.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть проведены при соответствующих температурах, которые могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Температура реакции будет зависеть, например, от температур плавления и кипения реагентов и растворителя, если он присутствует; термодинамики реакции (например, энергично экзотермическереакции возможно потребуются проводить при пониженной температуре) и кинетики реакции (например, при высоком энергетическом барьере активации возможно потребуются повышенные температуры). "Повышенная 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, содержащие реагенты или продукты, которые, по существу, вступают в реакцию с воздухом, могут быть осуществлены с использованием методов синтеза чувствительных к воздуху соединений, которые хорошо известны специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения получение соединений может включать добавление кислот или оснований для влияния, например, на катализ желаемой реакции или образование солевых форм, таких как соли присоединения кислот.

Примеры кислот могут представлять собой неорганические или органические кислоты. Неорганические кислоты включают соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, фосфорную кислоту и азотную кислоту. Органические кислоты включают муравьиную кислоту, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, бутановую кислоту, бензойную кислоту, 4-нитробензойную кислоту, метансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, винную кислоту, трифтороуксусную кислоту, пропиоловую кислоту, масляную кислоту, 2-бутиновую кислоту, винилуксусную кислоту, пентановую кислоту, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту и декановую кислоту.

Примеры оснований включают гидроксид лития, гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат лития, карбонат натрия, карбонат калия и гидрокарбонат натрия. Некоторые примеры сильных оснований включают, но не ограничиваются ими, гидроксиды, алкоксиды, амиды металлов, гидриды металлов, диалкиламиды металлов и ариламины, где алкоксиды включают литиевые, натриевые и калиевые соли метил, этил и трет-бутил оксидов; амиды металлов включают амид натрия, амид калия и амид лития; гидриды металлов включают гидрид натрия, гидрид калия и гидрид лития и диалкиламиды металлов включают натриевые и калиевые соли метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, триметилсилил и циклогексил замещенных амидов.

Промежуточные соединения и продукты могут также включать соли соединений, описанных в данном документе. Как используется в данном документе, термин "соль" относится к соли, образованной добавлением приемлемой кислоты или основания к соединению, описанному в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные соли представляет собой фармацевтически приемлемые соли. Как используется в данном документе, фраза "фармацевтически приемлемое" относится к веществу, которое является приемлемым для использования в фармацевтических применениях с токсикологической точки зрения и не проявляет вредное взаимодействие с активным ингредиентом. Фармацевтически приемлемые соли, включая моно- и би соли, включают, но не ограничиваются ими, те, которые получены из органических и неорганических кислот, таких как, но не ограничиваясь ими, уксусная, молочная, лимонная, коричная, винная, янтарная, фумаровая, малеиновая, малоновая, миндальная, яблочная, щавелевая, пропионовая, соляная, бромистоводородная, фосфорная, азотная, серная, гликолевая, пировиноградная, метансульфоновая, этансульфоновая, толуолсульфоновая, салициловая, бензойная и

аналогичные известные приемлемые кислоты. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418 и Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

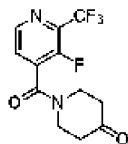
При проведении синтеза соединений в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут быть использованы обычные операции выделения и очистки, такие как упаривание, фильтрация, экстракция, твердофазная экстракция, перекристаллизация, хроматография и т.п. для выделения желаемых продуктов.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, или их соли являются по существу выделенными. "По существу выделенный" означает, что соединение по меньшей мере частично или по существу отделено от среды, в которой оно было образовано или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную соединением по данному изобретению. Существенное разделение может включать композицию, содержащую 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 массе соединения по данному изобретению или его соли. Способы выделения соединений и их солей являются рутинными в данной области техники.

Способы получения некоторых промежуточных соединений можно найти в патенте США № 8987443, выданном 24 марта 2015 г.; патенте США № 9487521, выданном 8 ноября 2016 г.; патенте США № 8410265, выданном 2 апреля 2013 г. и патенте США № 8765734, выданном 1 июля 2014 г., каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Способы и промежуточные соединения.

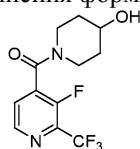
В данном изобретении, в частности, предложены способы и промежуточные соединения для получения соединения формулы I. Соответственно, в одном аспекте в данном документе предложен способ получения соединения формулы V



V

или его соли,

включающий приведение в контакт соединения формулы IV



IV

или его соли в условиях окисления с образованием указанного соединения формулы V.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанные условия окисления включают первый окислительный агент.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанные условия окисления включают второй окислительный агент.

В некоторых вариантах реализации изобретения первый окислительный агент представляет собой трихлоризоциануровую кислоту (ТЦИСА).

В некоторых вариантах реализации изобретения ТЦИСА присутствует в количестве от около 0,5 до около 0,7 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный второй окислительный агент представляет собой 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинокси (ТЕМРО).

В некоторых вариантах реализации изобретения ТЕМРО присутствует в количестве от около 0,015 до около 0,025 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт соединения формулы IV в условиях окисления дополнительно включает одно или более из гидрокарбоната натрия, карбоната натрия и бромида натрия.

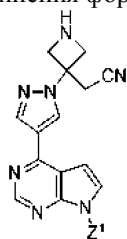
В некоторых вариантах реализации изобретения гидрокарбонат натрия присутствует в количестве от около 1 до около 10 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV. В некоторых вариантах реализации изобретения гидрокарбонат натрия присутствует в количестве около 5 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV. В некоторых вариантах реализации изобретения карбонат натрия присутствует в количестве от около 0,1 до около 1 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV. В некоторых вариантах реализации изобретения карбонат натрия присутствует в количестве около 0,5 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт соединения формулы IV в условиях окисления дополнительно включает компонент растворителя, содержащий дихлорметан. В некоторых вариантах реализации изобретения компонент растворителя дополнительно содержит воду.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанные условия окисления включают добавление трихлоризоциануровой кислоты (ТЦИКА) к раствору, содержащему соединение формулы IV и ТЕМРО при температуре от около 0 до около 5°C. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное добавление трихлоризоциануровой кислоты включает добавление трихлоризоциануровой кислоты по меньшей мере двумя порциями. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный раствор перемешивают после указанного добавления при температуре от около 0 до около 5°C в течение около 30 мин. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный способ дополнительно включает, после упомянутого перемешивания, нагревание указанного раствора до температуры от около 20 до около 25°C в течение от около 1 до около 2 ч.

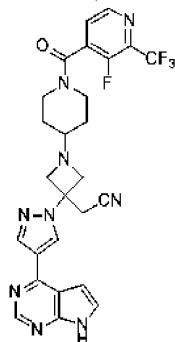
В некоторых вариантах реализации изобретения указанные условия окисления приводят к соединению формулы V, имеющему чистоту более чем около 99%.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в данном документе, дополнительно включают приведение в контакт соединения формулы V с соединением формулы VI:



VI

или его солью, в присутствии восстанавливающего агента, с образованием соединения формулы I:



I

или его соли;

где Z¹ представляет собой H или защитную группу.

В некоторых вариантах реализации изобретения Z¹ представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации изобретения восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия или триацетоксиборгидрид натрия. В некоторых вариантах реализации изобретения восстанавливающий агент представляет собой триацетоксиборгидрид натрия. В некоторых вариантах реализации изобретения используют более 1 эквивалента (например, 2 эквивалента) триацетоксиборгидрида натрия по отношению к соединению формулы VI.

В некоторых вариантах реализации изобретения используют более 1 эквивалента соединения формулы V по отношению к соединению формулы VI или его соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения реакцию соединения формулы VI или его соли с соединением формулы V проводят в растворителе дихлорметане.

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, представляет собой ингибитор JAK (например, JAK1, JAK2). Ингибиторы JAK являются пригодными при лечении различных JAK-ассоциированных заболеваний или расстройств. Примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают заболевания, связанные с иммунной системой, включающие, например, отторжение трансплантата органа (например, отторжение аллотрансплантата и болезнь трансплантат против хозяина). Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают аутоиммунные заболевания, такие как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, ювенильный артрит, псориаз, псориатический артрит, диабет типа I, волчанка, псориаз, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, тя-

желая миастения, нефропатия иммуноглобулина, миокардит, аутоиммунные заболевания щитовидной железы, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное аутоиммунное заболевание представляет собой аутоиммунное буллезное заболевание кожи, такое как пузырчатка обыкновенная (PV) или буллезный пемфигоид (BP).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают аллергические заболевания, такие как астма, пищевая аллергия, экзематозный дерматит, контактный дерматит, атопический дерматит (атопическая экзема) и ринит. Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний включают вирусные заболевания, такие как вирус Эпштейна-Барра (EBV), гепатит В, гепатит С, ВИЧ, HTLV 1, вирус ветряной оспы (VZV) и вирус папилломы человека (HPV).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированного заболевания включают заболевания, связанные с обновлением хряща, например подагрический артрит, септический или инфекционный артрит, реактивный артрит, рефлекторная симпатическая дистрофия, альгодистрофия, синдром Титце, реберная артропатия, эндемический деформирующий остеоартроз, болезнь Мселени, болезнь Гандигоду, дегенерации в результате фибромиалгии, системная красная волчанка, склеродермия или анкилозирующий спондилит (болезнь Бехтерева).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированного заболевания включают врожденные пороки развития хряща, включающие наследственный хондролит, хондродисплазии и псевдохондродисплазии (например, микроглия, энотия и метафизарная хондродисплазия).

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний или состояний включают расстройства кожи, такие как псориаз (например, псориаз обыкновенный), атопический дерматит, кожная сыпь, раздражение кожи, сенсibilизация кожи (например, контактный дерматит или аллергический контактный дерматит). Например, некоторые вещества, в том числе некоторые лекарственные средства при местном применении могут вызывать сенсibilизацию кожи. В некоторых вариантах реализации изобретения совместное введение или последовательное введение по меньшей мере одного ингибитора JAK по данному изобретению вместе с агентом, вызывающим нежелательную сенсibilизацию, может быть полезным при лечении такой нежелательной сенсibilизации или дерматита. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное расстройство кожи подвергают лечению путем местного введения по меньшей мере одного ингибитора JAK по данному изобретению.

Дополнительные примеры JAK-ассоциированных заболеваний или условий включают те, которые характеризуются как солидные опухоли (например, рак простаты, рак почки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудочно-кишечного тракта, рак молочной железы, рак легких, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, саркома Капоши, болезнь Кастрелмана, лейомиосаркома матки, меланома и т.п.), гематологические раки (например, лимфома, лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML) или множественная миелома) и рак кожи, такой как кожная Т-клеточная лимфома (CTCL) и кожная В-клеточная лимфома. Примеры CTCLs 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 раковые заболевания, ассоциированные с воспалением. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный рак является связанным с воспалительным заболеванием кишечника. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный рак, связанный с воспалением, представляет собой рак, связанный с колитом. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный рак, связанный с воспалением, представляет собой рак толстой кишки или колоректальный рак. В некоторых вариантах реализации изобретения указанный рак представляет собой рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), аденокарциному, рак тонкой кишки или рак прямой кишки.

JAK-ассоциированные заболевания могут дополнительно включать те, которые характеризуются экспрессией: мутантов JAK2, таких, как те, которые имеют по меньшей мере одну мутацию в псевдокиназном домене (например, JAK2V617F); мутантов JAK2, которые имеют по меньшей мере одну мутацию вне псевдокиназного домена; мутантов JAK1; мутантов JAK3; мутантов рецептора эритропоэтина (EPOR); или нерегулируемую экспрессию CRLF2.

JAK-ассоциированные заболевания могут дополнительно включать миелолипролиферативные заболевания (MPDs), такие как полицитемия вера (PV), эссенциальная тромбоцитемия (ET), миелофиброз с миелоидной метаплазией (MMM), первичный миелофиброз (PMF), хронический миелогенный лейкоз (CMML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), гиперэозинофильный синдром (HES), системный мастоцитоз (SMCD) и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное миелолипролиферативное расстройство представляет собой миелофиброз (например, первичный миелофиброз (PMF) или миелофиброз после полицитемии вера/после эссенциальной тромбоцитемии (Post-PV/Post-ET MF)). В некоторых вариантах реализации изобретения указанное миелолипролиферативное расстройство представляет собой миелофиброз после эссенциальной тромбоцитемии (Post-ET MF). В некоторых вариантах

реализации изобретения указанное миелопролиферативное расстройство представляет собой миелофиброз после полициемии вера (Post-PV MF).

Другие примеры JAK-ассоциированных заболеваний или состояний включают уменьшение интенсивности дерматологических побочных эффектов других лекарственных средств путем введения соединения по данному изобретению. Например, многочисленные фармацевтические агенты приводят к нежелательным аллергическим реакциям, которые могут проявляться в виде угревой сыпи или связанного с ними дерматита. Примеры фармацевтических агентов, которые имеют такие нежелательные побочные эффекты, включают противораковые препараты, такие как гефитиниб, цетуксимаб, эрлотиниб и т.п. Соединения по данному изобретению можно вводить системно или местно (например, локализовано в непосредственной близости от дерматита) в сочетании с (например, одновременно или последовательно) фармацевтическим агентом, имеющим нежелательный дерматологический побочный эффект. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение по данному изобретению можно вводить местно в сочетании с одним или более другими фармацевтическими препаратами, причем другие фармацевтические препараты при местном применении в отсутствие соединения по данному изобретению вызывают контактный дерматит, аллергические контактные сенсibilизации или подобное расстройство кожи. Соответственно, композиции по данному изобретению включают составы для местного введения, содержащие соединение по данному изобретению и дополнительный фармацевтический агент, который может вызвать дерматит, кожные заболевания или связанные с ними побочные эффекты.

Дополнительные JAK-ассоциированные заболевания включают воспаление и воспалительные заболевания. Примеры воспалительных заболеваний включают саркоидоз, воспалительные заболевания глаз (например, ирит, увеит, склерит, конъюнктивит или родственное заболевание), воспалительные заболевания дыхательных путей (например, заболевания верхних дыхательных путей, включающих нос и пазухи, такие как ринит или синусит, или нижних дыхательных путей, такие как бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких и т.п.), воспалительную миопатию, такую как миокардит, и другие воспалительные заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное воспалительное заболевание глаз представляет собой блефарит.

Дополнительные JAK-ассоциированные заболевания включают ишемически-реперфузионные повреждения или заболевания или состояния, связанные с воспалительным ишемическим событием, таким как инсульт или остановка сердца, болезненные состояния, связанные с эндотоксинами (например, осложнения после шунтирования или хронические состояния, обусловленные эндотоксинами, способствующие хронической сердечной недостаточности), анорексию, кахексию, усталость, такую как, например, вызванную или связанную с раком, рестеноз, склеродермит, фиброз, состояния, связанные с гипоксией или астроглиозом, такие как, например, диабетическая ретинопатия, рак, или нейродегенеративные и другие воспалительные заболевания, такие как синдром системного воспалительного ответа (SIRS) 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, такие как остеопороз или остеоартрит, заболевания костной резорбции, связанные с гормональным дисбалансом и/или гормональной терапией, аутоиммунными заболеваниями (например, костный саркоидоз) или раком (например, миелома).

Дополнительные JAK-ассоциированные заболевания включают расстройство сухого глаза. Как используется в данном документе, "расстройство сухого глаза" предназначено для обозначения болезненных состояний, обобщенных в недавнем официальном докладе Dry Eye Workshop (DEWS), который определяет сухой глаз, как "многофакторное заболевание слез и глазной поверхности, которое приводит к симптомам дискомфорта, нарушения зрения и нестабильности слезной пленки с потенциальным повреждением поверхности глаза. Оно сопровождается повышением 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 April 2007, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство сухого глаза выбрано из расстройства дефицита слез сухого глаза (ADDE), испарительного расстройства сухого глаза или их соответствующих комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство сухого глаза представляет собой синдром сухих глаз Шегрена (SSDE). В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство сухого глаза представляет собой нешегреновский синдром сухих глаз (NSSDE).

Дополнительные JAK-ассоциированные заболевания включают конъюнктивит, увеит (включая хронический увеит), хориодит, ретинит, циклит, склерит, эписклерит или ирит. Другие JAK-ассоциированные заболевания включают дыхательную дисфункцию или недостаточность, связанные с вирусной инфекцией, такой как грипп и ОРВИ.

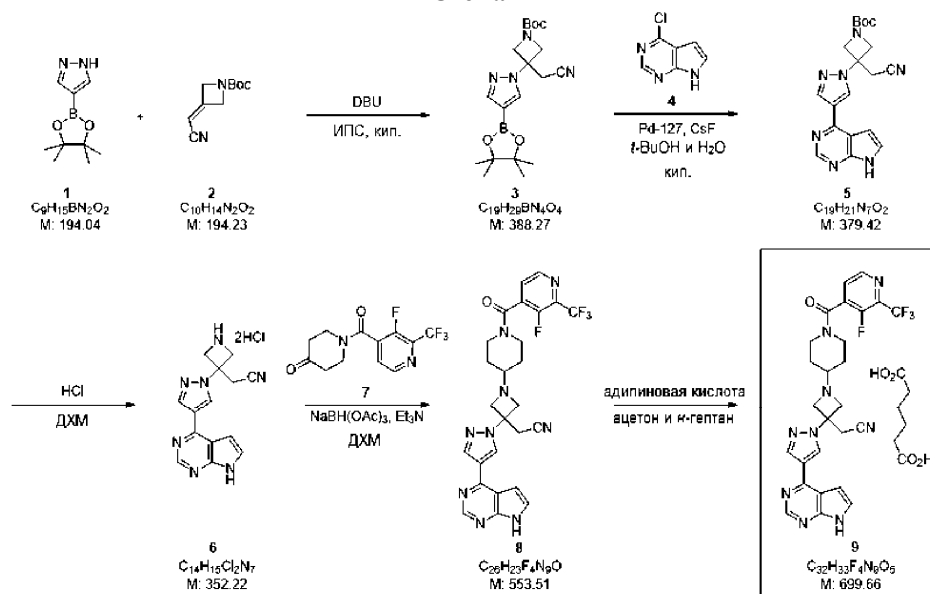
Примеры

Данное изобретение будет более подробно описано с помощью конкретных примеров. Следующие примеры предложены для иллюстративных целей и не направлены на ограничение данного изобретения

каким-либо образом. Специалисты в данной области техники легко распознают ряд некритических параметров, которые можно изменить или модифицировать с получением практически идентичных результатов.

Пример 1. Синтез 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)

Схема I



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

В 1-литровую колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой и механической мешалкой, последовательно добавляли изопропанол (ИПС, 200 мл), 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундецен (DBU, 9,8 г, 64,4 ммоль, 0,125 экв), 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол (1, 101 г, 520,51 ммоль, 1,01 экв) и трет-бутил 3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилат (2, 100 г, 514,85 ммоль) при температуре окружающей среды для получения реакционной смеси в виде суспензии. Полученную реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 30 мин с получением гомогенного раствора и смесь выдерживали при кипении с обратным холодильником дополнительно в течение 2-3 ч. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, к реакционной смеси постепенно добавляли н-гептан (400 мл) в течение 45 мин при поддержании кипения смеси с обратным холодильником. Твердые вещества выпадали в осадок во время добавления н-гептана. После того, как добавление н-гептана было завершено, смесь постепенно охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали при температуре окружающей среды дополнительно в течение 1 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (200 мл) и сушили под вакуумом при 50°C с продувкой азотом до постоянной массы с получением трет-бутил 3-(цианометил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-1-карбоксилата (3, 181 г, 199,9 г теоретически, 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.;

$C_{19}H_{29}BN_4O_4$ (ММ 388,27), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 389 ($M^+ + H$).

трет-Бутил 3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-3-(цианометил)-азетидин-1-карбоксилат (5).

В 1-литровую колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой и механической мешалкой, добавляли 4-хлор-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин (4, 39,6 г, 257,6 ммоль), трет-бутил 3-(цианометил)-3-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-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-(дициклогексилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (Pd-127, 351,4 мг, 0,46 ммоль, 0,0018 экв.) при температуре окружающей среды. Полученную реакционную смесь дегазировали и заполняли азотом 3 раза перед тем, как нагревали с обратным холодильником и выдерживали при кипении с обратным холодильником в атмосфере азота в течение 20-24 ч. Когда ВЭЖХ показала завершение реакции, реакционную смесь охлаждали до 45-55°C в течение 30 мин, две фазы разделяли и водную фазу отбрасывали. К органической фазе добавляли н-гептан (125 мл) в течение 30 мин при 45-55°C. Полученную смесь медленно охлаждали до температуры окружающей среды в течение 1 ч и перемешивали при

температуре окружающей среды дополнительно в течение 2 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (100 мл) и сушили под вакуумом при 50°C с продувкой азотом до постоянной массы с получением трет-бутил 3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилата (5, 96,8 г, 97,7 г теоретически, 99%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

Для 5: ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 8,89 (с, 1Н), 8,68 (с, 1Н), 8,44 (с, 1Н), 7,60 (д, $J=3,5$ Гц, 1Н), 7,06 (д, $J=3,6$ Гц, 1Н), 4,62-4,41 (м, 2Н), 4,31-4,12 (м, 2Н), 3,67 (с, 2Н), 1,39 (с, 9Н) м.д.;

^{13}C ЯМР (101 МГц, DMCO-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.;

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_2$ (ММ 379,4), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 380 (M^+H).

2-(3-(4-(7Н-Пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил дигидрохлоридная соль (6).

В 0,5-литровую колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой, капельной воронкой и механической мешалкой, добавляли трет-бутил 3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)-3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилат (5, 15 г, 39,5 ммоль), воду (7,5 мл, 416 ммоль) и дихлорметан (75 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре с получением суспензии. К суспензии добавляли раствор 5 М хлористого водорода (HCl) в изопропанол (55 мл, 275 ммоль, 7,0 экв) в течение 5 мин. Полученную реакционную смесь затем нагревали до слабого кипения с обратным холодильником и поддерживали при кипении с обратным холодильником в течение 3-4 ч. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, к реакционной суспензии добавляли трет-бутил метиловый эфир (МТБЭ, 45 мл). Смесь постепенно охлаждали до комнатной температуры и перемешивали дополнительно в течение 1 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали трет-бутил метиловым эфиром (МТБЭ, 45 мл) и сушили под вакуумом при 50°C с продувкой азотом до постоянной массы с получением 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил дигидрохлоридной соли (6, 13,6 г, 13,9 г теоретически, 98%) в виде твердого вещества от сероватого до светло-желтого цвета.

Для 6: ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) 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.;

^{13}C ЯМР (101 МГц, D_2O) 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.;

$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_7$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_7$ для свободного основания, ММ 279,30), ЖХ-МС (ЭИ) 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 трубкой для подачи азота, термопарой, капельной воронкой и механической мешалкой, добавляли 2-(3-(4-(7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-1Н-пиразол-1-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил дигидрохлоридную соль (6, 20 г, 56,78 ммоль), дихлорметан (200 мл) и триэтиламин (ТЭА, 16,62 мл, 119,2 ммоль, 2,1 экв) при температуре окружающей среды. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 мин перед добавлением к смеси 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7, 17,15 г, 57,91 ммоль, 1,02 экв). Смесь затем 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 в течение 2 ч. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором NaHCO_3 (200 мл). Две фазы разделяли и водную фазу экстрагировали метилхлоридом (200 мл). Объединенную органическую фазу промывали 4% расолом (100 мл) с последующей заменой растворителя с дихлорметана на ацетон путем перегонки. Полученный раствор желаемого неочищенного продукта (8) в ацетоне непосредственно использовали для последующего формирования адипатной соли. Небольшую часть раствора очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , градиентное элюирование 0-10% MeOH в EtOAc) 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 сероватого твердого вещества.

Для 8: ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) 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.;

^{13}C ЯМР (101 МГц, DMCO-d_6) 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.;

$\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}$ (ММ, 553,51), ЖХ-МС (ЭИ) 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)изо-

никотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-ил)ацетонитрил адипат (9).

В 0,5-литровую колбу, снабженную механической мешалкой, термопарой, капельной воронкой и трубкой для подачи азота, добавляли 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 адипиновую кислоту (8,7 г, 59,53 ммоль, 1,05 экв) при температуре окружающей среды. Реакционную смесь затем нагревали с обратным холодильником с получением раствора. К реакционной смеси постепенно добавляли н-гептан (220 мл) при 40-50°C в течение 1 ч. Полученную смесь постепенно охлаждали до температуры окружающей среды в течение 1 ч и перемешивали при температуре окружающей среды дополнительно в течение 16 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (2×60 мл) и сушили под вакуумом при 50°C с продуванием 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 теоретически, выход 85,6% для двух стадий) в виде твердого вещества от белого до сероватого цвета.

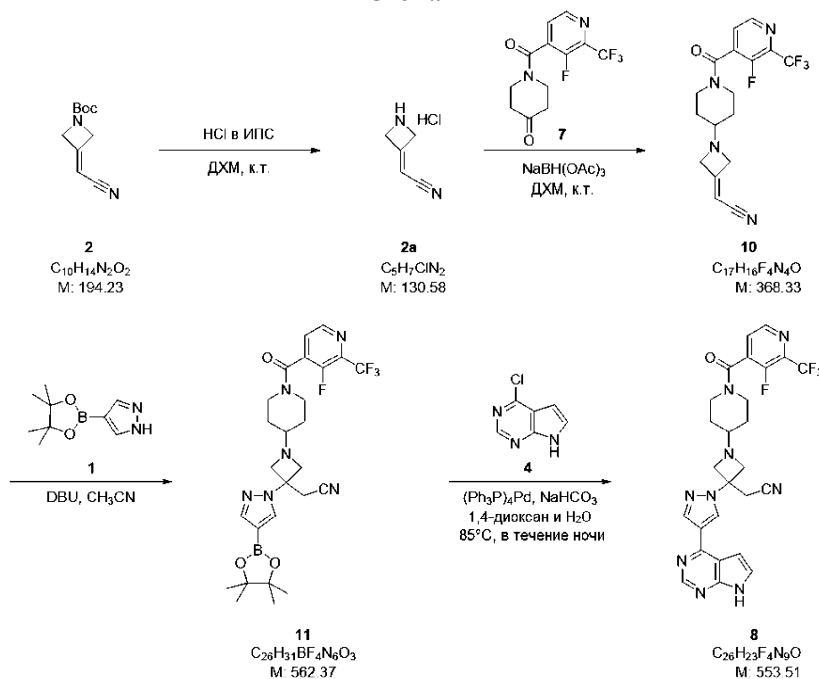
Для 9: ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,16 (с, 1H), 12,05 (уш с, 2H), 8,85 (с, 1H), 8,72 (с, 1H), 8,69 (д, J=4,7 Гц, 1H), 8,45 (с, 1H), 7,93 (т, J=4,7 Гц, 1H), 7,63 (дд, J=3,6, 2,3 Гц, 1H), 7,09 (дд, J=3,6, 1,7 Гц, 1H), 54,11 (дт, J=11,0, 4,4 Гц, 1H), 3,77 (д, J=7,8 Гц, 2H), 3,60 (т, J=7,8 Гц, 2H), 3,58 (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 (ММ 699,66; C₂₆H₂₃F₄N₉O для свободного основания, MW, 553,51), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 554,0 (M⁺+H).

Пример 2. Альтернативный синтез 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

Схема II



2-(Азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорид (2а).

В 0,5-литровую колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой и механической мешалкой, добавляли трет-бутил 3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилат (2, 30 г, 154,46 ммоль) и дихлорметан (300 мл) при температуре окружающей среды. Затем раствор обрабатывали раствором 5 М хлористого водорода (HCl) в изопропанол (294,2 мл, 1,54 моль, 10 экв.) при температуре окружающей среды и полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 18 ч. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, в суспензию добавляли трет-бутил метиловый эфир (МТБЭ, 150 мл) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Твердые вещества собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (2×100 мл) и сушили на фильтровальной воронке при температуре окружающей среды в течение 3 ч с получением 2-(азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорида (2а, 13,7 г, 20,2 г теоретически, 67,8%) в виде белого твердого

вещества.

Для 2а: ^1H ЯМР (500 МГц, DMCO-d_6) 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.;

^{13}C ЯМР (126 МГц, DMCO-d_6) δ 155,65, 114,54, 94,78, 55,26, 54,63 м.д.;

$\text{C}_5\text{H}_7\text{ClN}_2$ (MW 130,58; $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2$ для свободного основания, ММ 94,11), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 95 (M^+H).

2-(1-(1-(3-Фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-илиден)ацетонитрил (10).

В 0,25-литровую колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой и магнитной мешалкой, добавляли 2-(азетидин-3-илиден)ацетонитрил гидрохлорид (2а, 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 дихлорметан (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 в течение 2 ч перед гашением насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) (50 мл). Две фазы разделяли и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (200 мл). Объединенную органическую фазу промывали водой (50 мл), соевым раствором (50 мл) и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного желаемого продукта (10), который очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , градиентное элюирование 0-10% этилацетата в гексане) с получением 2-(1-(1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-ил)азетидин-3-илиден)ацетонитрила (10, 9,5 г, 12,7 г теоретически, 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 (кд, $J=36,1, 12,0$ Гц), 134,56 (д, $J=16,9$ Гц), 126,89, 120,58 (кд, $J=275,0, 4,9$ Гц), 115,11, 92,04, 62,05, 60,57 (2С), 44,47, 39,42, 29,38, 28,47 м.д.;

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}$ (ММ 368,33), ЖХ-МС (ЭИ) 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 25-мл колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой и магнитной мешалкой, добавляли 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. Раствор затем обрабатывали 1,8-диазабицикло[5,4,0]ундеценом (DBU, 173 мг, 0,17 мл, 1,12 ммоль, 1,12 экв) при температуре окружающей среды и полученную реакцию смесь нагревали до 50°C и перемешивали при 50°C в течение ночи. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, реакцию смесь непосредственно загружали в колонку на силикагеле (SiO_2) для хроматографической очистки (градиентное элюирование 0-2,5% MeOH в этилацетате) 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 теоретически, 46,7%) в виде белого твердого вещества.

Для 11: ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-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, DMCO-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 (кд, $J=35,0, 11,7$ Гц), 127,58, 120,61 (кд, $J=274,4, 4,6$ 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.;

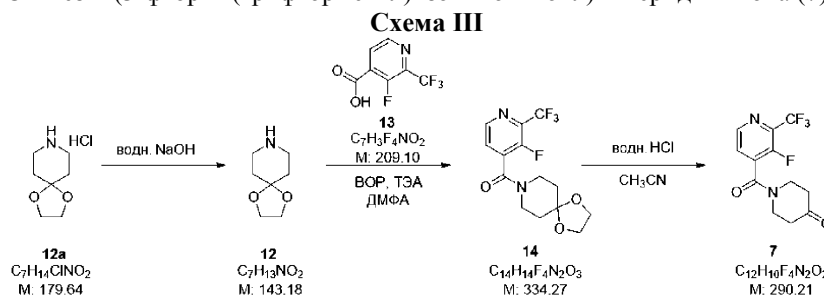
$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{BF}_4\text{N}_6\text{O}_3$ (ММ 562,37), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 563 (M^+H).

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 25-мл колбу, снабженную трубкой для подачи азота, термопарой, капельной воронкой и магнитной мешалкой, добавляли 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), гидрокарбонат натрия (NaHCO_3 , 229 мг, 2,72 ммоль, 5,0 экв), воду (1,6 мл) и 1,4-диоксан (1,6 мл) при температуре окружающей среды. Смесь затем обрабатывали тетраакис-(трифенилфосфин)палладием(0) (12,8 мг, 0,011 ммоль, 0,02 экв) при температуре окружающей среды и полученную реакцию смесь дегазировали и заполняли азотом 3 раза перед тем, как нагревали до 85°C . Реакционную смесь перемешивали при 85°C в атмосфере азота в течение ночи. После завершения реакции, отслеживаемого с помощью ВЭЖХ, реакцию смесь упаривали 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 теоретически,

44,6%), получали в виде сероватых твердых веществ непосредственной очисткой колоночной хроматографией на силикагеле (SiO_2) (градиентное элюирование 0-10% этилацетата в гексане) высушенной реакционной смеси. Соединение, полученное с использованием данного синтетического подхода, является идентичным во всех аспектах сравнения соединению 8, полученному синтетическим методом, описанным выше в Примере 1.

Пример 3. Синтез 1-(3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)пиперидин-4-она (7).



(3-Фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)(1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанол (14).

В 30-литровый реактор, снабженный 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 обрабатывали 1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан гидрохлоридом (3,13 кг, 17,43 моль) при температуре окружающей среды. Полученную смесь затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение 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 (Na_2SO_4 , 1,3 кг) и упаривали при пониженном давлении (70 мм рт.ст.) при 50°C после удаления реагента сушки, сульфата натрия (Na_2SO_4), путем фильтрации. Желтое масло, полученное таким образом, подвергали перегонке при пониженном давлении (80 мм рт.ст., т.кип $115\text{-}120^\circ\text{C}$) с получением 1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декана (2,34 кг, 2,496 кг теоретически, 93,8%) в виде прозрачного масла, которое непосредственно использовали в следующей реакции кросс-сочетания.

В высушенный 100-литровый реактор, снабженный механической мешалкой, капельной воронкой, термометром и вакуумным выпуском, загружали 3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)пиперидин-4-он (13, 3,0 кг, 14,35 моль), бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат (реагент BOP, 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 (DMFA, 18 л) при температуре окружающей среды. Полученный раствор затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение 20 мин, затем охлаждали до $5\text{-}10^\circ\text{C}$. Затем к реакционной смеси добавляли триэтиламин (Et_3N , 4 л, 28,67 моль, 2,0 экв) в течение 1 ч и внутреннюю температуру поддерживали между 5 и 10°C во время добавления триэтиламина. Темно-коричневый раствор, полученный таким образом, перемешивали в течение 12 ч при температуре окружающей среды (около 20°C) и затем охлаждали до около 10°C . При интенсивном перемешивании к охлажденной реакционной смеси последовательно добавляли 18 л насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) и 36 л воды и внутреннюю температуру поддерживали ниже 15°C . Осадок (осадок на фильтре), полученный таким образом, собирали фильтрованием. Водную фазу затем насыщали 12 кг твердого хлорида натрия (NaCl) и экстрагировали EtOAc (2×18 л). Объединенный органический слой последовательно промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) (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 упаривали при пониженном давлении ($40\text{-}50^\circ\text{C}$, 30 мм рт.ст.) с получением около 5,0 кг неочищенного желаемого продукта (14) в виде вязкого коричневого масла. Неочищенный продукт, полученный ранее, затем растворяли в EtOH (8,15 л) при 50°C и полученный раствор обрабатывали водой (16,3 л) в течение 30 мин при около 50°C . В коричневый раствор вносили затравку перед постепенным охлаждением 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 ($\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O} = 1:20$, 2 л) и сушили при пониженном давлении (50 мм рт.ст.) при температуре около 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 теоретически, 83,0%) в виде белого твердого вещества.

Для 14: ^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6) δ 8,64 (д, $^3J_{\text{HH}}=4,68$ Гц, 1H, NCH в пиридине), 7,92 (дд, $^3J_{\text{HH}}=4,68$ Гц, $^4J_{\text{HF}}=4,68$ Гц, 1H, NCCH в пиридине), 3,87-3,91 (м, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,70 (уш с, 2H, один из NCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,26 (т, $^3J_{\text{HH}}=5,86$ Гц, 2H, один из NCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 1,67 (д, $^3J_{\text{HH}}=5,86$ Гц, 2H, один из NCCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 1,58 (уш с, 2H, один из NCCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении) м.д.;

^{13}C ЯМР (75 МГц, ДМСО- d_6) δ 161,03 (N=C=O), 151,16 (д, $^1J_{\text{CF}}=266,03$ Гц, C-F), 146,85 (д, $^4J_{\text{CF}}=4,32$ Гц, NCH в пиридине), 135,24 (д, $^2J_{\text{CF}}=11,51$ Гц, C-C=O), 135,02 (к, $^2J_{\text{CF}}=34,57$ Гц, NCCF $_3$), 128,24 (д, $^4J_{\text{CF}}=7,48$ Гц, NCCN в пиридине), 119,43 (д \times к, $^1J_{\text{CF}}=274,38$ Гц, $^3J_{\text{CF}}=4,89$ Гц, CF $_3$), 106,74 (ОСО), 64,60 (ОССО), 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.;

^{19}F ЯМР (282 МГц, ДМСО- d_6) δ -64,69 (д, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, F $_3$ C), -129,26 (д \times к, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, $^4J_{\text{FH}}=3,96$ Гц, FC) м.д.;

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_3$ (ММ, 334,27), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 335,1 (M^++H).

1-(3-Фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-он (7).

В 4-горлую круглодонную колбу на 5 л, снабженную механической мешалкой, термопарой, капельной воронкой и трубкой для подачи азота, загружали (3-фтор-2-(трифторметил)пиперидин-4-ил)(1,4-диокса-8-азаспиро[4,5]декан-8-ил)метанол (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 6,0н. водным раствором соляной кислоты (HCl) (450 мл, 2,70 моль, 9,0 экв), в то время как внутреннюю температуру поддерживали ниже 10°C . Полученную реакционную смесь затем постепенно нагревали до комнатной температуры и с помощью капельной воронки медленно вводили в реакционную смесь дополнительное количество 6,0н. водного раствора соляной кислоты (HCl) (1050 мл, 6,30 моль, 21,0 экв) при температуре окружающей среды в течение 8 ч. После завершения реакции, отсепариваемого с помощью ВЭЖХ, реакционную смесь затем охлаждали до 0°C перед обработкой 30% водным раствором гидроксида натрия (NaOH, 860 мл, 8,57 ммоль, 28,6 экв), в то время как внутреннюю температуру поддерживали ниже 10°C . Полученную реакционную смесь затем нагревали до температуры окружающей среды перед добавлением твердого гидрокарбоната натрия (NaHCO $_3$, 85,0 г, 1,01 моль, 3,37 экв) в течение 1 ч. Смесь затем экстрагировали EtOAc (2 \times 1,2 л) и объединенную органическую фазу промывали 16% водным раствором хлорида натрия (2 \times 800 мл) и упаривали до около 1,0 л путем вакуумной перегонки. К остатку добавляли н-гептан (2,1 л) и полученную смесь упаривали до 1,0 л путем вакуумной перегонки. К упаренной смеси добавляли н-гептан (2,1 л). Затем полученную белую взвесь упаривали до около 1,0 л вакуумной перегонкой. К белой взвеси затем добавляли метил трет-бутиловый эфир (MTBE, 1,94 л). Белый мутный раствор нагревали до 40°C с получением прозрачного раствора. Полученный раствор упаривали до около 1,0 л вакуумной перегонкой. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Белый осадок собирали фильтрованием, промывали н-гептаном (400 мл) и сушили на фильтре в атмосфере азота под вытягивающем вакуумом с получением 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7, 78,3 г, 86,8 г теоретически, в результате чего выход 90,2%, и чистота 98% по данным ВЭЖХ) в виде сероватого твердого вещества.

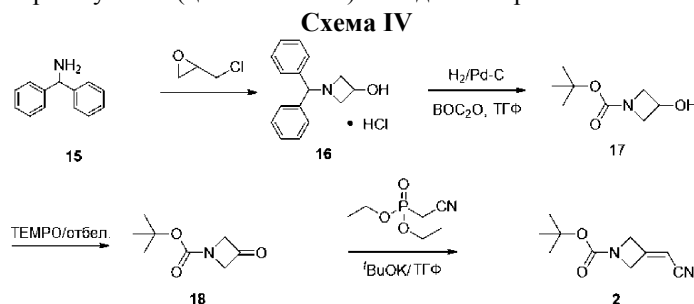
Для 7: ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,68 (д, $^3J_{\text{HH}}=4,69$ Гц, 1H, NCH в пиридине), 7,97 (дд, $^3J_{\text{HH}}=4,69$ Гц, $^4J_{\text{HF}}=4,69$ Гц, 1H, NCCN в пиридине), 3,92 (уш с, 2H, один из NCH $_2$ в пиперидиновом кольце, один из другого NCH $_2$ в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,54 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,15$ Гц, 2H, один из NCH $_2$ в пиперидиновом кольце, один из другого NCH $_2$ в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 2,48 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,44$ Гц, 2H, NCCCH $_2$), 2,34 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,15$ Гц, 2H, NCCCH $_2$) м.д.;

^{13}C ЯМР (75 МГц, ДМСО- d_6) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N=C=O), 151,26 (д, $^1J_{\text{CF}}=266,89$ Гц, C-F), 146,90 (д, $^4J_{\text{CF}}=6,05$ Гц, NCH в пиридине), 135,56 (C-C=O), 134,78 -135,56 (м, NCCF $_3$), 128,27 (д, $^3J_{\text{CF}}=7,19$ Гц, NCCN в пиридине), 119,52 (д \times к, $^1J_{\text{CF}}=274,38$ Гц, $^3J_{\text{CF}}=4,89$ Гц, CF $_3$), 45,10 (NC в пиперидиновом кольце) м.д., один углерод (NCC в пиперидиновом кольце) отсутствует из-за перекрытия с (CD $_3$) $_2$ SO;

^{19}F ЯМР (282 МГц, ДМСО- d_6) δ -64,58 (д, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, F $_3$ C), -128,90 (д \times к, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, $^4J_{\text{FH}}=4,05$ Гц, FC) м.д.;

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (ММ, 290,21), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 291,1 (M^++H).

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



1-Бензгидрилазетидин-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) из капельной воронки при температуре окружающей среды. Во время первоначального добавления была замечена небольшая эндотерма. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней перед нагреванием с обратным холо-

дильником дополнительно в течение 3 дней. Когда ТСХ показала завершение реакции, реакционную смесь сначала охлаждали до комнатной температуры, а затем до 0-5°C на ледяной бане. Твердые вещества собирали фильтрованием и промывали ацетоном (4 л) с получением первой порции неочищенного желаемого продукта (1516 г). Фильтрат упаривали при пониженном давлении и полученное полутвердое вещество разбавляли ацетоном (1 л). Данное твердое вещество затем собирали фильтрованием с получением второй порции неочищенного желаемого продукта (221 г). Неочищенный продукт, 1-бензгидрилизетидин-3-ол гидрохлорид (1737 г, 3998,7 г теоретически, выход 43,4%), был достаточно чистым для использования в следующей реакции без дополнительной очистки.

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 (MW 275,77; C₁₆H₁₇NO для свободного основания, MM, 239,31), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 240 (M⁺+H).

трет-Бутил 3-гидроксиазетидин-1-карбоксилат (17).

Суспензию 1-бензгидрилизетидин-3-ол гидрохлорида (625 г, 2,27 моль) в 10% водном растворе карбоната натрия (Na₂CO₃, 5 л) и дихлорметана (CH₂Cl₂, 5 л) перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока все твердые вещества не растворились. Два слоя разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (CH₂Cl₂, 2 л). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия (Na₂SO₄) и упаривали при пониженном давлении. Полученное неочищенное свободное основание 1-бензгидрилизетидин-3-ола затем растворяли в ТГФ (6 л) и раствор помещали в большую бомбу Parr. В бомбу Parr добавляли ди-трет-бутил дикарбонат (BOC₂O, 545 г, 2,5 моль, 1,1 экв) и 20% палладий (Pd) на угле (125 г, 50% влаги). Сосуд заполняли газообразным водородом (H₂) до 30 фунтов на квадратный дюйм и перемешивали в постоянной атмосфере водорода (сосуд заполняли три раза для поддержания давления 30 фунтов/кв. дюйм) при комнатной температуре в течение 18 ч. Когда ВЭЖХ показывала завершение реакции (прекращалось поглощение водорода), реакционную смесь фильтровали через слой целита и слой целита промывали ТГФ (4 л). Фильтраты упаривали при пониженном давлении, чтобы удалить растворитель, и остаток загружали на колонку Biotage 150 с минимальным количеством дихлорметана (CH₂Cl₂). Колонку элюировали 20-50% этилацетата в n-гептане и фракции, содержащие чистый желаемый продукт, трет-бутил 3-гидроксиазетидин-1-карбоксилат, собирали и объединяли. Растворители удаляли при пониженном давлении с получением трет-бутил 3-гидроксиазетидин-1-карбоксилата (357 г, 393,2 г теоретически, выход 90,8%) в виде бесцветного масла, которое затвердевало при стоянии при комнатной температуре под вакуумом.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃), δ 4,56 (м, 1H), 4,13 (м, 2H), 3,81 (м, 2H), 1,43 (с, 9H) м.д.

трет-Бутил 3-оксоазетидин-1-карбоксилат (18).

Раствор трет-бутил 3-гидроксиазетидин-1-карбоксилата (50 г, 289 ммоль) в этилацетате (400 мл) охлаждали до 0°C. Полученный раствор затем обрабатывали твердым ТЕМПО (0,5 г, 3,2 ммоль, 0,011 экв) и раствором бромид калия (KBr, 3,9 г, 33,2 ммоль, 0,115 экв) в воде (60 мл) при 0-5°C. Сохраняя температуру реакции между 0-5°C, добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO₃, 450 мл) и водный раствор гипохлорита натрия (NaClO, 10-13% активного хлора, 450 мл). После того, как добавили раствор гипохлорита натрия, цвет реакционной смеси сразу же изменился. При добавлении дополнительного количества раствора гипохлорита натрия, реакционная смесь постепенно обесцвечивалась. Когда ТСХ показала, что весь исходный материал был израсходован, цвет реакционной смеси больше не менялся. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (EtOAc, 500 мл) и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой (500 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (500 мл) и сушили над сульфатом натрия (Na₂SO₄). Затем растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, трет-бутил 3-оксоазетидин-1-карбоксилата (48 г, 49,47 г теоретически, выход 97%), который был достаточно чистым и его непосредственно использовали в следующей реакции без дополнительной очистки.

¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц) δ 4,65 (с, 4H), 1,42 (с, 9H) м.д.

трет-Бутил-3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилат (2).

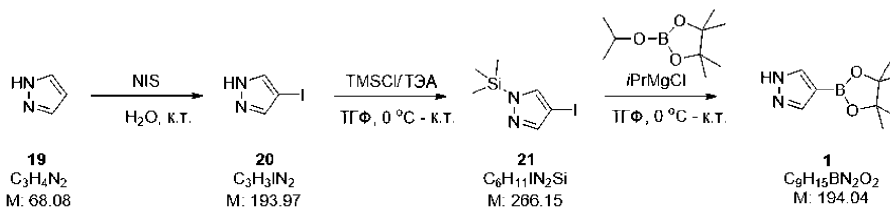
В четырехгорлую колбу, снабженную термопарой, капельной воронкой и защитной трубкой для подачи азота, добавляли диэтил цианометил фосфат (745 г, 4,20 моль, 1,20 экв) и безводный тетрагидрофуран (ТГФ, 9 л) при комнатной температуре. Раствор охлаждали на бане метанола со льдом до -14°C и добавляли 1,0 M раствор калий трет-бutoксида (t-BuOK) в безводном тетрагидрофуране (ТГФ, 3,85 л, 3,85 моль, 1,1 экв) в течение 20 мин при поддержании температуры реакции ниже -5°C. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при -10°C и добавляли раствор 1-трет-бutoксикарбонил-3-азетидинона (600 г, 3,50 моль) в безводном тетрагидрофуране (ТГФ, 2 л) в течение 2 ч при поддержании внутренней температуры ниже -5°C. Реакционную смесь перемешивали при температуре от -5 до -10°C в течение 1 ч, а затем медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли водой (4,5 л) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (NaCl, 4,5 л) и экстрагировали этилацетатом (EtOAc, 2×9 л). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (6 л) и сушили над безводным сульфатом натрия (Na₂SO₄).

Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток разбавляли дихлорметаном (CH₂Cl₂, 4 л) перед абсорбированием на силикагеле (SiO₂, 1,5 кг). Неочищенный продукт, который был абсорбирован на силикагеле, очищали колоночной флэш-хроматографией (SiO₂, 3,5 кг, градиентное элюирование 0-25% EtOAc/гексаны) с получением трет-бутил 3-(цианометил)азетидин-1-карбоксилата (2, 414,7 г, 679,8 г теоретически, выход 61%) в виде белого твердого вещества.

Для 2: ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 5,40 (м, 1H), 4,70 (м, 2H), 4,61 (м, 2H), 1,46 (с, 9H) м.д.; C₁₀H₁₄N₂O₂ (ММ, 194,23), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 217 (M⁺+Na).

Пример 5. Синтез 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола.

Схема V



4-Йодпиразол (20).

В колбу, снабженную трубкой для подачи азота, капельной воронкой, термопарой и механической мешалкой, загружали пиразол (1, 450 г, 6,62 моль) и тетрагидрофуран (ТГФ, 5 л) при температуре окружающей среды. Смесь затем охлаждали до 10°C и к смеси порциями добавляли твердый N-йодсукцинимид (NIS, 1490 г, 6,62 моль, 1,0 экв) при температуре около 10°C. Полученную реакционную смесь затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч (может быть необходимо более длительное время реакции 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 тиосульфата натрия (2×3 л) (органический слой светлеет до бледно-желтого цвета), водой (2×3 л) и соевым раствором (2 л). Полученный органический слой затем сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением 4-йодпиразола (1138 г, 1284,1 г теоретически, 88,6%) в виде от белого до бледно-желтого твердого вещества после сушки в вакуумной печи при температуре около 30°C в течение ночи.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 13,17 (уш с, 1H), 7,93 (уш с, 1H), 7,55 (уш с, 1H) м.д.;

C₃H₃IN₂ (ММ, 193,97), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 195 (M⁺+H).

1-Триметилсилил-4-йодпиразол (21).

В колбу, снабженную обратным холодильником, трубкой для подачи азота, механической мешалкой и термопарой, загружали 4-йодпиразол (200 г, 1,03 моль) и ТГФ (2 л) при температуре окружающей среды. К данному раствору добавляли триэтиламин (ТЭА, 158 мл, 1,13 моль, 1,1 экв) и полученный раствор охлаждали до 0°C в ледяной бане с солью. К данному раствору при интенсивном перемешивании добавляли хлортриметилсилан (TMS-Cl, 137 мл, 1,08 моль, 1,05 экв), позволяя температуре достигнуть 18°C. (Реакционная смесь становится очень густой, и ее становится трудно размешать, но с течением времени становится податливой). Когда экзотермический процесс утихал, холодную баню удаляли и реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. За ходом реакции следили с помощью ГХ, и ее посчитали завершенной через около 1 ч (выборка реакции должна быть выполнена в отсутствие воздуха и разбавлена сухим растворителем для предотвращения гидролиза TMS). Реакционную смесь затем разбавляли n-гептаном (2 л) перед фильтрацией в атмосфере азота. Растворитель удаляли из фильтрата при пониженном давлении, продувая роторный испаритель азотом. Остаточное масло разбавляли n-гептаном (1 л) и повторно упаривали. Если при добавлении n-гептана образовывались твердые частицы, была необходима вторая фильтрация. Остаток затем перегоняли при пониженном давлении (70-90°C при около 0,5 мм рт.ст.) с использованием аппарата Кюгельрора с получением 1-триметилсилил-4-йодпиразола (263 г, 274,1 г теоретически, 96%) в виде бесцветного масла. Данный материал должен храниться постоянно в атмосфере азота, поскольку группа TMS быстро гидролизует. Впоследствии было установлено, что 1-триметилсилил-4-йодпиразол может быть получен путем нагревания йодпиразола с 2 эквивалентами гексаметилдисилазана в течение 1 ч.

4-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (1).

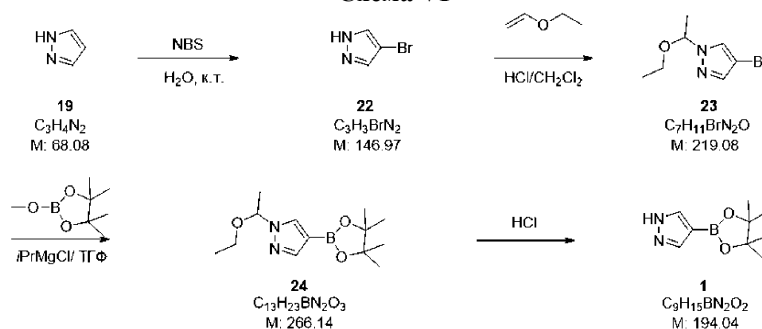
В колбу, снабженную механической мешалкой, трубкой для подачи азота, капельной воронкой и термопарой загружали 1-триметилсилил-4-йодпиразол (225,1 г, 0,85 моль) и ТГФ (2200 мл) при температуре окружающей среды. Данную смесь охлаждали до около -6°C на бане со льдом/солью/рассолом перед добавлением раствора изопропилмагний хлорида в ТГФ (2 М раствор в ТГФ, 510 мл, 1,02 моль, 1,2 экв) с такой скоростью, чтобы внутренняя температура не превышала 0°C. Степень обмена металл/галоген контролировали с помощью ГХ, и реакция завершалась через около 10 мин. К оранжево-коричневому раствору затем медленно добавляли 2-изопропокси-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (изопропилпинаколборат, 347 мл, 1,7 моль, 2,0 экв), сначала поддерживая температуру ниже 0°C, и затем

довольно быстро, после того, как было добавлено около половины соединения, температуре позволяли достичь 5°C (реакционная смесь становится достаточно густой, а затем медленно разжижается). Реакционную смесь затем перемешивали при 0°C в течение 10 мин перед нагреванием до температуры окружающей среды в течение 1 ч и перемешивали при комнатной температуре дополнительно в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до около 6°C и добавляли насыщенный водный раствор хлорида аммония (NH₄Cl, 2,2 л) при повышении температуры до 25°C. Смесь перемешивали в течение 5 мин перед разбавлением толуолом (10 л). Слои разделяли (большое количество твердого вещества присутствует в водном слое) и органический слой последовательно промывали водой (6×2,2 л) и солевым раствором (2×2,2 л), затем сушили над сульфатом натрия (Na₂SO₄). Реагент для сушки, сульфат натрия (Na₂SO₄), удаляли фильтрованием и раствор упаривали 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 теоретически, 54,8%) в виде белого твердого вещества.

Для 1: ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,08 (уш с, 1H), 7,94 (с, 1H), 7,62 (с, 1H), 1,23 (с, 12H) м.д.; C₉H₁₅BN₂O₂ (ММ, 194,04), ЖХ-МС (ЭИ) 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) суспендировали в воде (625 мл) при температуре окружающей среды. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь экстрагировали EtOAc (2×100 мл). Объединенные экстракты EtOAc промывали водным Na₂S₂O₃ и солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного 4-бромпиразола (72,0 г, 73,5 г теоретически, выход 98%) в виде белых твердых веществ (чистота по ГХ: >98%), которые непосредственно использовали в следующей реакции без дополнительной очистки.

4-Бром-1-(этоксипропил)-1H-пиразол (23).

К раствору 4-бромпиразола (70,0 г, 0,476 моль) в CH₂Cl₂ (600 мл) добавляли раствор 3,1 М HCl в диоксане (4 мл) и этил виниловый 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 NaHCO₃ и два слоя разделяли. Органический слой промывали водой, сушили над Na₂SO₄ и упаривали досуха при пониженном давлении с получением 4-бром-1-(этоксипропил)-1H-пиразола (113 г, 104,3 г теоретически, 97% выход) в виде масла (чистота по ГХ: 89%), который непосредственно использовали в следующей реакции без дополнительной очистки.

1-(Этоксипропил)-4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (24).

К 100 мл раствора iPrMgCl-LiCl (50 ммоль, 1,8 экв) в ТГФ добавляли 4-бром-1-(этоксипропил)-1H-пиразол (6,15 г, 28 ммоль) при температуре окружающей среды. Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 12 ч и затем охлаждали до -20°C. Затем к реакционной смеси добавляли метоксипинаколат (10,6 г, 67 ммоль, 2,4 экв) при -20°C. Полученную смесь перемешивали при 0-10°C в течение 1 ч. Для гашения реакции добавляли водный раствор NH₄Cl. Затем смесь экстрагировали петролейным эфиром (ПЭ). Объединенные экстракты ПЭ промывали насыщенным раствором NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт кристаллизировали в ПЭ с получением 1-(этоксипропил)-4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола (24, 4,2 г, 7,45 г теоретически, выход 56,4%) в виде от белого до сероватого твердого вещества (чистота по ГХ: 99%).

Для 24: ¹H ЯМР (ДМСО-d₆ 400 МГц) δ 8,09 (с, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,62 (с, 1H), 5,55 (к, 1H, J=6,1 Гц), 3,37 (дк, 1H, J=7,1, 9,6 Гц), 3,12 (дк, 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.;

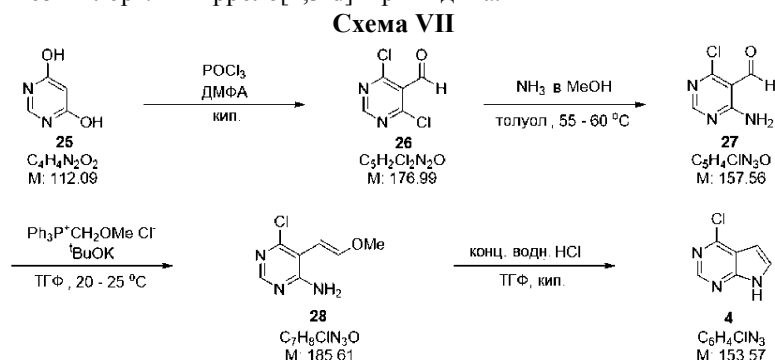
C₁₃H₂₃BN₂O₃ (ММ, 266,14), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 267 (M⁺+H).

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-этоксипропил)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразола (24, 55,0 кг, 206,7 моль) в 1,2-дихлорэтане (750 кг) медленно добавляли раствор HCl в МТБЭ (25,0 кг, 20-30% HCl) при 0-5°C. Полученную реакционную смесь затем

перемешивали при 10-20°C в течение 3-5 ч. После того, как селективная реакция снятия защиты была завершена по данным ВЭЖХ (1: менее 1%), реакционную смесь дегазировали и заполняли азотом, затем охлаждали до -15°C. К охлажденной реакционной смеси затем добавляли триэтиламин (ТЭА, 30,0 кг, 296,5 моль) для доведения pH до 7-8. Затем смесь постепенно нагревали до температуры окружающей среды перед обработкой водой (150 кг). Две фазы разделяли и органический слой промывали солевым раствором (60 кг) и сушили над сульфатом натрия (Na₂SO₄). Реагент для сушки, сульфат натрия (Na₂SO₄), удаляли фильтрованием и полученный раствор упаривали при пониженном давлении при 40-50°C до густого масла. Остаток нагревали до 60-70°C и разбавляли петролейным эфиром (100 кг) при той же температуре. Полученную смесь затем постепенно охлаждали до температуры окружающей среды и затем до -5°C и перемешивали при той же температуре в течение 3 ч. Твердые вещества собирали центрифугированием и сушили при 50-60°C под вакуумом с получением неочищенного желаемого продукта (1, 33,75 кг, 40,11 кг теоретически, 84,1%). Неочищенный желаемый продукт затем суспендировали в 1,2-дихлорэтане (30 кг) и полученную смесь нагревали с обратным холодильником до получения прозрачного раствора. К горячему раствору затем добавляли петролейный эфир (150 кг) при той же температуре. Полученную смесь затем постепенно охлаждали до температуры окружающей среды и затем до -5°C и перемешивали при той же температуре в течение 3 ч. Твердые вещества собирали центрифугированием и сушили под вакуумом при 50-60°C с получением 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пирозола (1, 31,0 кг, 40,11 кг теоретически, 77,3%) в виде сероватого твердого вещества, которое является идентичным во всех аспектах сравнения материалу, синтезированному по методу синтеза, описанному выше в Примере 5.

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



4,6-Дихлорпиримидин-5-карбальдегид (26).

В 4-горлую колбу на 5 л, снабженную механической мешалкой, капельной воронкой, холодильником, термопарой и трубкой для подачи N₂ в водный промывной раствор NaOH, загружали оксихлорид фосфора (POCl₃, 1 л, 10,572 моль, 4,82 экв) и охлаждали на ледяной бане с солью. Затем в колбу по каплям добавляли N,N-диметилформамид (DMFA, 320 мл, 4,138 моль, 1,85 экв) при 0±2°C. После добавления около 100 мл DMFA в течение около 0,5 ч происходила кристаллизация, и температуру реакции увеличивали до 0-10°C. Добавление прекращали и смесь оставляли повторно охлаждаться до около 2°C. Остальной DMFA добавляли в течение 2,5 ч при температуре ниже 8°C. Суспензия стала очень густой, затрудняя перемешивание. Когда добавление DMFA было завершено, смесь перемешивали при 3-5°C в течение 0,5 ч. Порциями добавляли твердый 4,6-дигидроксипиримидин (250 г, 2,232 моль). После того, как была добавлена примерно треть 4,6-дигидроксипиримидина, реакционная смесь становилась более подвижной и происходили медленные экзотермические явления с увеличением температуры реакции до около 12°C в течение 0,5 ч. Остальной 4,6-дигидроксипиримидин добавляли порциями в течение 0,25 ч с увеличением температуры реакции от 12 до 27°C. Температуру реакции поддерживали на уровне 25-27°C периодическим охлаждением, в течение этого времени желтая суспензия становилась более жидкой, а затем снова густой. Когда экзотермический процесс утихал, через около 1 ч, реакционную смесь медленно нагревали. При около 55°C реакционная смесь становилась очень густой, и происходило второе легкое экзотермическое явление. Нагревательный кожух удаляли в то время, как температура реакции продолжала увеличиваться до около 63°C и оставалась на том же уровне в течение нескольких минут перед снижением. Нагревание смеси возобновляли до установления слабого кипения с обратным холодильником (около 100°C). При температуре около 95°C началось устойчивое, довольно быстрое выделение газа HCl, и реакционная смесь постепенно становилась более жидкой и темнела. Примерно через 0,5 ч образовывался прозрачный коричневый раствор, а температура кипения с обратным холодильником медленно увеличивалась до 115°C в течение 1,25 ч. Через в общей сложности 2,5 ч кипячения с обратным холодильником реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды. Избыточное количество POCl₃ (как можно больше) удаляли при пониженном давлении (температура бани 45-50°C). Оставшееся густое коричневое масло очень медленно выливали в холодную H₂O (5 л) в делительной воронке на 20 л при добавлении льда по мере необходимости для поддержания комнатной температуры водной смеси. Водную смесь экс-

трагировали EtOAc (2×3 л с последующим 1×2 л). Объединенные экстракты EtOAc промывали H₂O (2×2,5 л), насыщенным водным раствором NaHCO₃ (1 л), соевым раствором (1 л), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении (температура бани 35°C) с получением неочищенного 4,6-дихлорпиримидин-5-карбальдегида (270 г, 395 г теоретически, 68,4%) в виде желто-оранжевых твердых веществ. Порцию 20 г данного неочищенного материала очищали перегонкой в аппарате Кюгельрора (температура печи 90-100°C, 225 мТорр) с получением 15,3 г чистого 4,6-дихлорпиримидин-5-карбальдегида в виде белого твердого вещества, которое пожелтело при стоянии при комнатной температуре.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 10,46 (с, 1H), 8,89 (с, 1H) м.д.

4-Амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегид (27).

Раствор 7 M NH₃ 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 реакции медленно увеличивалась от 20 до 26°C, и образовывалась желтая суспензия. Применяли мягкое охлаждение для поддержания температуры реакции ниже 26°C. Суспензию перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3,5 ч, после чего твердые вещества собирали путем фильтрации. Твердые вещества промывали EtOAc (1 л). Фильтрат упаривали 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. Твердое вещество, отфильтрованное из реакционной смеси, содержало дополнительное количество 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегида. Продукт экстрагировали из данного отфильтрованного твердого вещества путем перемешивания в EtOAc (1,25 л) в течение 1,5 ч, фильтрования, затем перемешивания в ТГФ (750 мл) в течение 1 ч и снова фильтрования. Оба фильтрата, EtOAc и ТГФ, упаривали при пониженном давлении и полученные твердые вещества растирали с толуолом и н-гептаном (2:1 об./об., 450 мл), фильтровали и сушили с получением дополнительно 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 теоретически) был 78,6%.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 10,23 (с, 1H), 8,71 (уш с, 1H), 8,55 (уш с, 1H), 8,39 (с, 1H) м.д.;

C₇H₄ClN₃O (ММ, 157,56), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 158 (M⁺+H).

6-Хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламин (28).

Суспензию (метоксиметил)трифенилфосфоний хлорида (276,0 г, 0,807 моль, 1,1 экв) в ТГФ (1,5 л) охлаждали на ледяной бане с солью до -2°C и добавляли 1 M калий трет-бутоксид (KO^tBu) в ТГФ (807 мл, 0,807 моль, 1,1 экв) в течение 1,5 ч при температуре от -2 до -3°C. Темную красно-оранжевую смесь перемешивали при температуре от -2 до -3°C в течение 1 ч. Затем к реакционной смеси порциями добавляли твердый 4-амино-6-хлорпиримидин-5-карбальдегид (115,2 г, 0,7338 моль, 1,0 экв) с использованием ТГФ (200 мл) для промывки контейнера и воронки. В процессе добавления температура реакции увеличилась с -3 до 13°C, и смесь приобрела коричневый цвет. Когда температура реакции упала до 10°C, охлаждающую баню удаляли и реакционную смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 42 ч. Реакционную смесь охлаждали до -2°C перед гашением медленным добавлением насыщенного водного раствора NH₄Cl (750 мл). Смесь упаривали при пониженном давлении для удаления большей части ТГФ. Остаток распределяли между EtOAc (3 л) и H₂O (1 л). Органическую фазу фильтровали для удаления нерастворимого материала на границе раздела, затем экстрагировали 2 N HCl (4×250 мл) с последующим добавлением 3 N HCl (2×250 мл). Объединенные экстракты HCl вновь экстрагировали этилацетатом (500 мл), затем фильтровали через целит, чтобы удалить нерастворимый материал. Фильтрат охлаждали на ледяной бане с солью, доводили pH до 8 с помощью 6 N водного раствора NaOH и экстрагировали EtOAc (3×1 л). Объединенные экстракты EtOAc промывали соевым раствором (1 л), сушили над Na₂SO₄, перемешивали с углем (10 г) и силикагелем (10 г) в течение 1 ч. Смесь фильтровали через целит, промывая целит EtOAc (1 л). Фильтрат упаривали, совместным выпариванием остаточного EtOAc с н-гептаном (500 мл). Полученное коричневое твердое вещество помещали под высокий вакуум в течение 2 ч с получением неочищенного 6-хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламина (72,3 г, 136,2 г теоретически, 53,1%). Неочищенный желаемый продукт использовали в следующей реакции без дополнительной очистки. Образец неочищенного продукта (2,3 г) очищали колоночной хроматографией на силикагеле 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, который являлся смесью 1:2 E/Z изомеров.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) для E-изомера: δ 8,02 (с, 1H), 7,08 (уш с, 2H), 6,92 (д, 1H, J=13,1 Гц), 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.;

C₇H₈ClN₃O (ММ, 185,61), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 186/188 (M⁺ + H).

4-Хлор-7Н-[пирроло[2,3-d]пиримидин (4).

К раствору неочищенного 6-хлор-5-(2-метоксивинил)пиримидин-4-иламина (70,0 г, 0,3784 моль) в ТГФ (700 мл) добавляли конц. HCl (5 мл) и полученную реакционную смесь нагревали с обратным холо-

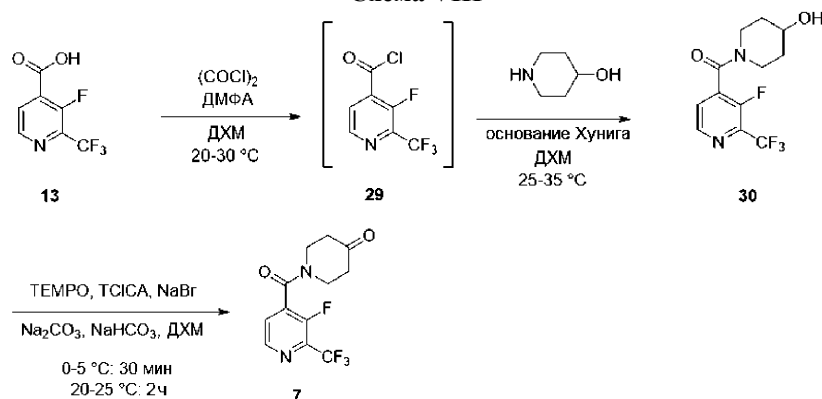
дильником в течение 7,5 ч. При нагревании образовывалась легкая суспензия, которая постепенно повторно растворялась. Когда реакцию считали завершённой по контролю ВЭЖХ, реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. К реакционной смеси добавляли твердый NaHCO_3 (15 г) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли уголь (7 г), силикагель (7 г) и Na_2SO_4 (20 г) и смесь нагревали до 40°C в течение 1 ч. Смесь затем охлаждали до температуры окружающей среды и фильтровали через целит, промывая целит ТГФ (1 л). Фильтрат упаривали 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 теоретически, 100%) в виде желто-коричневого твердого вещества. Данный неочищенный желаемый продукт растворяли в EtOAc (1 л) при $50-55^\circ\text{C}$ и обрабатывали активированным углем (3 г). Смесь фильтровали в горячем состоянии через целит, промывая целит теплым EtOAc (250 мл). Фильтрат упаривали до около 500 мл и суспензию оставляли стоять при температуре окружающей среды в течение ночи. Затем суспензию охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, после чего твердые вещества собирали путем фильтрации. Твердые вещества сушили с получением чистого 4-хлор-7Н-[пирроло[2,3-d]пиримидина (4, 54,5 г, 58,1 г теоретически, 94%) в виде желто-коричневых кристаллов.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-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.;

ЖХ-МС (ЭИ) m/e 154/156 (M^+).

Пример 8. Альтернативный синтез 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7).

Схема VIII



Стадия 1. (3-Фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)(4-гидроксипиперидин-1-ил)метанон (30).

К раствору 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиновой кислоты (13) (54,01 г, 258,3 ммоль) в дихлорметане (270 мл) добавляли N,N-диметилформамид (0,34 г, 4,65 ммоль) при комнатной температуре. К данному раствору добавляли оксалил хлорид (34,41 г, 271,2 ммоль) в дихлорметане (81 мл) в течение 30 мин через капельную воронку, в то время как внутреннюю температуру поддерживали на уровне $15-25^\circ\text{C}$. Капельную воронку промывали дихлорметаном (27 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с получением коричневого раствора. Дихлорметан отгоняли при температуре 30°C при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане (270 мл) и растворитель отгоняли при пониженном давлении при 30°C . Полученный остаток растворяли в дихлорметане (270 мл) с получением раствора 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил хлорида (29) в дихлорметане. В другую колбу добавляли 4-гидроксипиперидин (33,18 г, 328 ммоль), дихлорметан (270 мл) и N,N-диизопропилэтиламин (108 мл, 619,9 ммоль). Смесь нагревали до 33°C с образованием раствора. Смесь охлаждали до комнатной температуры. К полученному раствору добавляли 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил хлорид (29) в дихлорметане при температуре $25-35^\circ\text{C}$. После добавления смесь перемешивали при $25-35^\circ\text{C}$ дополнительно в течение 1 ч. В контейнер добавляли воду (430 мл) и 37% соляную кислоту (62,4 г, 633 ммоль). К реакционной смеси добавляли разбавленную соляную кислоту при внутренней температуре ниже 25°C . После перемешивания смеси в течение 30 мин органическую фазу собирали путем разделения. Органическую фазу промывали 9,5% солевым раствором (210 г). Водные фазы объединяли и экстрагировали дихлорметаном (430 мл). Органические фазы объединяли и промывали 4,5% солевым раствором (210 мл) и водой (215 мл). Дихлорметан удаляли путем замены растворителя на 2-метокси-2-метилпропан (МТБЭ). Остаток в МТБЭ (135 мл) нагревали при 60°C в течение 1 ч. Смесь постепенно охлаждали до 0°C с кристаллизацией (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)(4-гидроксипиперидин-1-ил)метанона. Смесь фильтровали, и влажный осадок на фильтре промывали МТБЭ (27 мл). Твердые вещества сушили при 50°C с получением (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)(4-гидроксипиперидин-1-ил)метанона (30). (69,95 г, 92%) в виде светло-коричневых твердых веществ.

ВЭЖХ-МС: 293,0 ($\text{M}+\text{H}$).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 3,09-3,99 (м, 4H); 1,37-1,80 (м, 4H); 3,75 (м, 1H); 4,84 (д, 1H (b));

8,65 (д, 1H, J=4,7 Гц); 7,89 (дд, 1H, J=4,7, J=4,7 Гц);

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6) δ 33,5, 34,3, 38,9, 44,0, 65,0, 120,6, 127,6, 134,5, 134,7, 146,2, 152,2; 160,2;

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (ММ 292,23), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 293,0 (M^+H).

Было определено, что чистота соединения 30, полученного данным методом, более чем около 98%, по данным ВЭЖХ.

Стадия 2. 1-(3-Фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-он (7).

В колбу добавляли (3-фтор-2-(трифторметил)пиридин-4-ил)(4-гидроксипиперидин-1-ил)метанол (30) (50 г, 171,1 ммоль), дихлорметан (733 мл), воду (766 мл), гидрокарбонат натрия (71,4 г, 849,7 ммоль), карбонат натрия (99,1 г, 85,2 ммоль), бромид натрия (1,76 г, 17,1 ммоль) и 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (ТЕМРО) (0,535 г, 3,42 ммоль) при 15-25°C. Смесь охлаждали до 0-5°C. К смеси порциями за четыре раза добавляли 1,3,5-трихлор-1,3,5-триазиан-4,4,6-трион (23,8 г, 102 ммоль) в течение 10 мин. Смесь перемешивали при температуре 0-5°C в течение 30 мин, а затем смесь нагревали до 20-25°C в течение 30 мин. После перемешивания смеси при 20-25°C еще в течение 1 ч реакционную смесь гасили добавлением метанола (26,23 мл, 647,5 ммоль) при 20-25°C. Смесь перемешивали в течение 20 мин и фильтровали через слой целита. Слой целита (20 г) промывали дихлорметаном (50 мл). Органическую фазу отделяли. Органическую фазу последовательно промывали 6% соевым раствором (266 г) и водой (250 мл). К органической фазе добавляли активированный уголь (3,5 г). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 30 мин ее фильтровали через слой целита (20 г). Фильтровальный слой промывали дихлорметаном (50 мл). Дихлорметан удаляли путем замены растворителя на 2-метокси-2-метилпропан (МТБЭ) и остаток в МТБЭ (180 мл) нагревали до 50-60°C. К теплой смеси (500 мл) постепенно добавляли гептан (500 мл), в то время как внутреннюю температуру поддерживали выше 50°C для кристаллизации продукта. Смесь постепенно охлаждали до 10°C и фильтровали. Влажный осадок на фильтре промывали гептаном (2×75 мл). Твердые вещества сушили при пониженном давлении с получением 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7) (49,7 г, выход 87,9%) в виде твердых веществ от сероватого до коричневого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,68 (д, $^3J_{\text{HH}}=4,69$ Гц, 1H, NCH в пиридине), 7,97 (дд, $^3J_{\text{HH}}=4,69$ Гц, $^4J_{\text{HF}}=4,69$ Гц, 1H, NCCN в пиридине), 3,92 (уш с, 2H, один из NCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,54 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,15$ Гц, 2H, один из NCH_2 в пиперидиновом кольце, один из другого NCH_2 в пиперидиновом кольце, оба в экваториальном положении), 2,48 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,44$ Гц, 2H, NCCCH_2), 2,34 (т, $^3J_{\text{HH}}=6,15$ Гц, 2H, NCCCH_2) м.д.;

^{13}C ЯМР (75 МГц, ДМСО- d_6) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (д, $^1J_{\text{CF}}=266,89$ Гц, C-F), 146,90 (д, $^4J_{\text{CF}}=6,05$ Гц, NCH в пиридине), 135,56 (C-C=O), 134,78-135,56 (м, NCCF_3), 128,27 (д, $^3J_{\text{CF}}=7,19$ Гц, NCCN в пиридине), 119,52 (д × к, $^1J_{\text{CF}}=274,38$ Гц, $^3J_{\text{CF}}=4,89$ Гц, CF_3), 45,10 (NC в пиперидиновом кольце) м.д., один углерод (NCC в пиперидиновом кольце) отсутствует из-за перекрытия с $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$;

^{19}F ЯМР (282 МГц, ДМСО- d_6) δ -64,58 (д, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, F_3C), -128,90 (д × к, $^4J_{\text{FF}}=15,85$ Гц, $^4J_{\text{FH}}=4,05$ Гц, FC) м.д.;

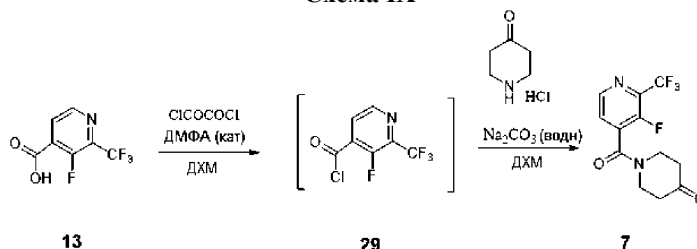
$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (ММ, 290,21), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 291,1 (M^+H).

Было определено, что чистота соединения 7, полученного данным методом, от около 90 до около 96%, по данным ВЭЖХ.

Следует отметить, что использование избытка окислителя (например, ТЕМРО) может приводить к повышенному образованию примесей и снижению выхода. Более длительное время окисления может также привести к повышенному образованию примесей и снижению выхода.

Пример 9. Альтернативный синтез 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7).

Схема IX



1-(3-Фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-он (7).

К раствору 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиновой кислоты (13) (20 г, 96,65 ммоль) в дихлорметане (150 мл) добавляли N,N-диметилформамид (0,13 г, 1,72 ммоль) при комнатной температуре. К данному раствору добавляли оксалил хлорид (12,75 г, 100,4 ммоль) в дихлорметане (40 мл) в течение 30 мин через капельную воронку, в то время как внутреннюю температуру поддерживали на уровне 15-25°C. Капельную воронку промывали дихлорметаном (10 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч с получением коричневого раствора промежуточного соединения 3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил хлорида. В раствор добавляли 4-пиперидон моногидрат гидрохлорид (19,1 г,

124,3 ммоль). Смесь охлаждали до 0-5°C и добавляли водный раствор карбоната натрия (20,28 г, 191,3 ммоль) в воде (200 мл). После добавления смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Органическую фазу отделяли и последовательно промывали 6% соевым раствором (110 г) и водой (100 мл). К органической фазе добавляли активированный уголь (1,4 г). После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 60 мин смесь фильтровали через слой целита (5 г). Фильтровальный слой промывали дихлорметаном (40 мл). Дихлорметан удаляли путем замены растворителя на 2-метокси-2-метилпропан (МТБЭ) и остаток в МТБЭ (100 мл) нагревали до 50-60°C. К тепловой смеси постепенно добавляли гептан (250 мл), в то время как внутреннюю температуру поддерживали выше 50°C для кристаллизации продукта. Смесь постепенно охлаждали до 10°C и фильтровали. Влажный осадок на фильтре промывали гептаном (2×40 мл). Твердые вещества сушили при пониженном давлении с получением 1-(3-фтор-2-(трифторметил)изоникотиноил)пиперидин-4-она (7) (25,8 г, выход 92,7%) в виде твердых веществ от сероватого до коричневого цвета.

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 из NCH₂ в пиперидиновом кольце, один из другого NCH₂ в пиперидиновом кольце, оба в аксиальном положении), 3,54 (т, ³J_{HH}=6,15 Гц, 2H, один из NCH₂ в пиперидиновом кольце, один из 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 (д × к, 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 (д × к, ⁴J_{FF} =15,85 Гц, ⁴J_{FH}=4,05 Гц, FC) м.д.;

C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (ММ, 290,21), ЖХ-МС (ЭИ) m/e 291,1 (M⁺+H).

Было определено, что чистота соединения 7, полученного данным методом, более чем около 99%, по данным ВЭЖХ.

Пример А. Анализ JAK киназы in vitro.

Соединение формулы I тестировали на активность в ингибировании мишеней JAK согласно следующему анализу in vitro, описанному в Park et al., Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104. Каталитические домены человека JAK1 (а.о. 837-1142) и JAK2 человека (а.о. 828-1132) с N-концевой His меткой были экспрессированы с использованием бакуловируса в клетках насекомых и очищены. Каталитическую активность JAK1 и JAK2 анализировали путем измерения фосфорилирования биотинилированного пептида. Фосфорилированный пептид детектировали гомогенной флуоресценцией с временным разрешением (HTRF). IC₅₀ соединений измеряли для каждой киназы в 40 мкл реакциях, которые содержат фермент, АТФ и 500 нМ пептида в 50 мМ Tris (pH 7,8), буфер с 100 мМ NaCl, 5 мМ DTT и 0,1 мг/мл (0,01%) БСА. Для измерений 1 мМ IC₅₀ концентрация АТФ в реакциях составляла 1 мМ. Реакции проводили при комнатной температуре в течение 1 ч и затем останавливали 20 мкл 45 мМ ЭДТА, 300 нМ SA-APC, 6 нМ Eu-Py20 в аналитическом буфере (Perkin Elmer, Boston, MA). Связывание с меченым европием антителом проводили в течение 40 мин и сигнал HTRF измеряли на планшетном ридере Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). Соединение формулы I и его соль адипиновой кислоты имели IC₅₀ при JAK1 ≤5 нМ (измеренную при 1 мМ АТФ) с соотношением JAK2/JAK1 >10 (измеренным при 1 мМ АТФ).

Пример В: Клеточные анализы.

Линии раковых клеток, зависящие от цитокинов и, следовательно, от передачи сигналов JAK/STAT, для роста могут быть высеяны при 6000 клеток/лунку (формат 96-луночного планшета) в среде RPMI 1640, 10% ФБС и 1 нг/мл соответствующего цитокина. Соединения могут быть добавлены к клеткам в ДМСО/среде (конечная концентрация ДМСО 0,2%) и инкубируются в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Эффект соединения на жизнеспособность клеток оценивали с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega) с последующим подсчетом на TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Потенциальные нецелевые эффекты соединений измеряли параллельно с использованием клеточной линии, не обусловленной JAK с тем же считыванием анализа. Все эксперименты, как правило, выполняли в двух экземплярах.

Вышеуказанные клеточные линии также могут быть использованы для изучения влияния соединений на фосфорилирование JAK киназ или потенциальных нисходящих субстратов, таких как STAT белки, Akt, Shp2 или Erk. Данные эксперименты могут быть выполнены после ночного цитокинового голодания с последующей краткой предварительной инкубацией с соединением (2 часа или менее), и цитокиновой стимуляцией около 1 ч или менее. Белки затем экстрагировали из клеток и анализировали с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области техники, включающих Вестерн-блоттинг или ИФА с использованием антител, которые могут дифференцироваться между фосфорилированным и общим белком. Данные эксперименты могут использовать здоровые или раковые клетки для исследования активности соединений на биологию выживания опухолевых клеток или на медиаторы воспалительного заболевания. Например, в отношении последнего цитокина, такие как IL-6, IL-12,

IL-23, или IFN могут быть использованы для стимулирования активации JAK, приводящей к фосфорилированию белка (белков) STAT и, возможно, к транскрипционным профилям (оцениваемым при помощи технологии определения генетической информации или кПЦР) или к продуцированию и/или секреции белков, таких как IL-17. Способность соединений ингибировать данные эффекты, опосредованные цитокинами, может быть измерена с использованием методов, известных специалисту в данной области техники.

Соединения, описанные в данном документе, могут также быть протестированы в клеточных моделях, предназначенных для оценки их эффективности и активности против мутантных JAK, например, мутации JAK2V617F, найденной в миелоидных пролиферативных расстройствах. Данные эксперименты часто используют цитокин-зависимые клетки гематологической линии (например, BaF/3), в которые эктопически экспрессируются JAK киназы дикого типа или мутанты (James, C., et al. *Nature*, 434:1144-1148; Staerk, J., et al. *JBC*, 280:41893-41899). Конечные критерии оценки включают эффекты соединений на выживание клеток, пролиферацию и фосфорилированные белки JAK, STAT, Akt или Erk.

Определенные соединения, описанные в данном документе, могут быть оценены на их активность в ингибировании пролиферации Т-клеток. Таким анализом можно считать анализ пролиферации, опосредованной вторым цитокином (т.е. JAK), а также упрощенный анализ иммунного подавления или ингибирования активации иммунной системы. Ниже приводится краткое описание того, как можно проводить такие эксперименты. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали из образцов цельной крови человека с использованием метода разделения Ficoll Нураque, и Т-клетки (фракция 2000) можно получать из МКПК декантацией. Свежевыделенные Т-клетки человека можно хранить в культуральной среде (RPMI 1640 дополненная 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при плотности 2×10^6 клеток/мл при 37°C в течение до 2 дней. Для анализа пролиферации клеток, стимулированной ИЛ-2, Т-клетки сначала обрабатывали фитогемагглютинином (РНА) при конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 72 ч. После промывания один раз ФСБ 6000 клеток/лунку высевали в 96-луночные планшеты и обрабатывали соединениями при различных концентрациях в культуральной среде в присутствии 100 ед./мл ИЛ-2 человека (ProSpec-Tany TechnoGene; Реховот, Израиль). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 72 ч и индекс пролиферации оценивали с использованием люминесцентных реагентов CellTiter-Glo, следуя протоколу производителя (Promega; Мэдисон, Висконсин).

Пример С. Противоопухолевая эффективность *in vivo*.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть оценены в моделях ксенотрансплантатов опухолей человека у мышей с пониженным иммунитетом. Например, онкогенный вариант клеточной линии плазмцитомы INA-6 может быть использован для подкожной инокуляции мышей SCID (Burger, R., et al. *Nematol. J.* 2:42-53, 2001). Животные с опухолями могут быть рандомизированы на группы лечения лекарственными средствами или носителем, и различные дозы соединений могут быть введены любым количеством обычных способов, включая пероральный, внутривентриальный или непрерывную инфузию с использованием имплантируемых насосов. Рост опухоли отслеживали с течением времени с помощью циркуля. Кроме того, образцы опухоли могут быть собраны в любое время после начала лечения для анализа, как описано выше (Пример В) для оценки эффектов соединения на активность JAK и нисходящие сигнальные пути. Кроме того, селективность соединения (соединений) может быть оценена с использованием моделей ксенотрансплантатов опухолей, которые опосредованы другими известными киназами (например, Vcr-Abl), таких как модель опухоли K562.

Пример D. Тест на ответ мышшиной кожной контактной гиперчувствительности замедленного типа.

Соединения, описанные в данном документе, также могут быть протестированы на их эффективность (ингибирования мишеней JAK) в модели тестирования мышшиной гиперчувствительности замедленного типа, опосредованной Т-клетками. Ответ мышшиной кожной контактной гиперчувствительности замедленного типа (DTH) считается действующей моделью клинического контактного дерматита и других иммунных расстройств кожи, опосредованных Т-лимфоцитами, таких как псориаз (*Immunol Today*. 1998 Jan; 19(1):37-44). Мышиная DTH имеет несколько общих характеристик с псориазом, включающих иммунный инфильтрат, сопровождающее увеличение воспалительных цитокинов и гиперпролиферацию кератиноцитов. Кроме того, многие классы агентов, которые являются эффективными при лечении псориаза в клинике, также являются эффективными ингибиторами DTH ответа у мышей (*Agents Actions*. 1993 Jan; 38(1-2):116-21).

На день 0 и 1 мышей Balb/c сенсibilизировали местным введением на их выбритый живот антигена 2,4-динитрофторбензола (DNFB). На день 5 измеряли толщину ушей с помощью инженерного микрометра. Данное измерение записывали и использовали в качестве базовой линии. Оба уха животных затем стимулировали местным введением в общей сложности 20 мкл DNFB (10 мкл на внутренней поверхности ушной раковины и 10 мкл на внешней поверхности ушной раковины) при концентрации 0,2%. Через от 24 до 72 ч после стимуляции уши измеряли снова. Лечение тестируемыми соединениями вводили во время фаз сенсibilизации и стимуляции (от дня -1 до дня 7) или до и во время фазы стимуляции (как правило, от второй половины дня 4 до дня 7). Лечение тестируемыми соединениями (в различной концентрации) вводили либо системно, либо местно (местное введение лечения на уши). Эффективности

тестируемых соединений оценивали по сокращению опухания уха по сравнению с ситуацией без лечения. Соединения, вызывающие снижение на 20% или более, были признаны эффективными. В некоторых экспериментах мышей стимулировали, но не сенсибилизировали (отрицательный контроль).

Эффект ингибирования (ингибирования активации путей JAK-STAT) тестируемыми соединениями может быть подтвержден с помощью иммуногистохимического анализа. Активация JAK-STAT пути (путей) приводит к образованию и транслокации функциональных факторов транскрипции. Кроме того, приток иммунных клеток и увеличение пролиферации кератиноцитов также должны обеспечивать уникальные изменения профиля экспрессии в ухе, которые могут быть исследованы и количественно определены. Срезы уха, фиксированные в формалине и заключенные в парафин, (собранные после фазы стимуляции в модели DTH) подвергали иммуногистохимическому анализу с использованием антитела, которое специфически взаимодействует с фосфорилированным STAT3 (клон 58E12, Cell Signaling Technologies). Уши мышей обрабатывали тестируемым соединением, носителем или дексаметазоном (клинически эффективное средство для лечения псориаза) или не проводили обработку, в модели DTH для сравнения. Тестируемые соединения и дексаметазон могут приводить к подобным транскрипционным изменениям как качественно, так и количественно, и как тестируемые соединения, так и дексаметазон могут уменьшить количество инфильтрирующих клеток. Как системное, так и местное введение тестируемых соединений может приводить к эффектам ингибирования, т. е., уменьшению количества инфильтрирующих клеток и ингибированию изменений транскрипции.

Пример Е. Противовоспалительная активность *in vivo*.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть оценены в моделях грызунов или не грызунов, предназначенных для воссоздания простого или сложного ответа воспаления. Так, например, модель артрита на грызунах может быть использована для оценки терапевтического потенциала дозируемых соединений, профилактически или терапевтически. Данные модели включают, но не ограничиваются ими, модели коллаген-индуцированного артрита на мышах или крысах, адьювант-индуцированного артрита и коллаген антитело-индуцированного артрита на крысах. Аутоиммунные заболевания, включающие, но не ограничивающиеся ими, множественный склероз, сахарный диабет типа I, увеоретинит, тиреоидит, тяжелую миастению, иммуноглобулиновые нефропатии, миокардит, сенсибилизацию дыхательных путей (астма), волчанку или колит, могут также быть использованы для оценки терапевтического потенциала соединений, описанных в данном документе. Данные модели хорошо зарекомендовали себя в научном сообществе 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. Модели на животных для лечения сухого глаза, увеита и конъюнктивита.

Агенты могут быть оценены в одной или нескольких доклинических моделях сухого глаза, известных специалистам в данной области техники, включающих, но не ограничиваясь этим, кроличью модель введения конканавалина А (ConA) в слезную железу, мышиную модель введения скополамина (подкожно или трансдермально), мышиную модель введения ботулинического токсина в слезную железу, или в любой из ряда спонтанных аутоиммунных моделей грызунов, что приводят к дисфункции слезной 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 полностью включена в данный документ посредством ссылки). Конечные критерии оценки в данных моделях могут включать гистопатологию слезных желез и глаза (роговицы и т.д.) и, возможно, классический тест Ширмера или его модифицированные версии (Barabino et al.), в которых измеряют продуцирование слез. Активность может быть оценена путем дозирования несколькими способами введения (например, системного или местного), которые могут начинаться до или после того, как измеримое заболевание имеет место.

Агенты могут быть оценены в одном или нескольких доклинических моделях увеита, известных специалистам в данной области техники. Они включают, но не ограничиваются ими, модели экспериментального аутоиммунного увеита (EAU) и увеита, индуцированного эндотоксинами (EIU). Эксперименты с EAU могут быть выполнены на кроликах, крысах или мышах, и могут включать пассивную или активную иммунизацию. Так, например, любой из ряда антигенов сетчатки может быть использован для сенсибилизации животных к соответствующему иммуногену, после чего животных можно стимулировать окулярно с тем же антигеном. Модель EIU более острая и включает местное или системное введение липополисахарида в сублетальных дозах. Конечные критерии оценки для обеих моделей EIU и EAU могут включать осмотр глазного дна и гистопатологию, среди прочих. Данные модели рассмотрены Smith et al. (Immunology and Cell Biology, 1998, 76, 497-512, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Активность оценивали путем дозирования несколькими способами введения (например, системного или местного), которые могут начинаться до или после того, как измеримое заболевание имеет место. Некоторые модели, перечисленные выше, могут также привести к склерит/эписклериту, хориодиту, циклиту или ириту и, следовательно, полезны при исследовании потенциальной активности соединений для терапевтического лечения данных заболеваний.

Агенты также могут быть оценены в одном или нескольких доклинических моделях конъюнктивит-

та, известных специалистам в данной области техники. Они включают, но не ограничиваются ими, модели на грызунах с использованием морской свинки, крысы или мыши. Данные модели на морских свинках включают те, которые используют протоколы активной или пассивной иммунизации и/или иммунной стимуляции с антигенами, такими как овальбумин или амброзия (рассмотрены в Groneberg, D.A., et al., *Allergy*, 2003, 58, 1101-1113, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Крысиные и мышьиные модели похожи в общем дизайне на модели морской свинки (также рассмотрены Groneberg). Активность может быть оценена путем дозирования несколькими способами введения (например, системного или местного), которые могут начинаться до или после того, как измеримое заболевание имеет место. Конечные критерии оценки для таких исследований могут включать, например, гистологический, иммунологический, биохимический или молекулярный анализ глазных тканей, таких как конъюнктива.

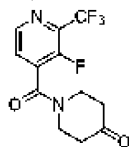
Пример G. Защита костей *in vivo*.

Соединения могут быть оценены в различных доклинических моделях остеопении, остеопороза или резорбции костной ткани, известных специалистам в данной области техники. Например, для оценки способности соединений влиять на признаки и маркеры ремоделирования и/или плотности костной ткани могут быть использованы грызуны после овариэктомии (W.S.S. Jee and W. Yao, *J. Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В альтернативном варианте плотность и структура костной ткани могут быть оценены у контрольных или обработанных соединением грызунов в моделях лечения (например, глюкокортикоид)индуцированной остеопении (Yao, et al. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; и id. 58(11), 1674-1686, оба включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Кроме того, эффекты соединений на резорбцию и плотность костной ткани могут быть оценены в моделях артрита на грызунах, описанных выше (Пример E). Конечные критерии оценки для всех данных моделей могут варьироваться, но часто включают гистологические и радиологические оценки, а также иммуногистологию и соответствующие биохимические маркеры ремоделирования костной ткани.

Был описан ряд вариантов реализации изобретения. Тем не менее понятно, что можно осуществлять различные модификации, не выходя за рамки сущности и объема изобретения. Соответственно, другие варианты реализации изобретения находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

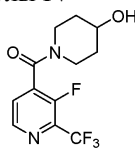
1. Способ получения соединения формулы V



V

или его соли,

включающий реакцию соединения формулы IV



IV

или его соли в условиях окисления с образованием указанного соединения формулы V.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанные условия окисления включают первый окислительный агент.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что указанные условия окисления включают второй окислительный агент.

4. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что первый окислительный агент представляет собой трихлоризоциануровую кислоту.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что трихлоризоциануровая кислота присутствует в количестве от около 0,5 до около 0,7 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV.

6. Способ по любому из пп.3-5, отличающийся тем, что указанный второй окислительный агент представляет собой 2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (TEMPO).

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что TEMPO присутствует в количестве от 0,015 до 0,025 мольных эквивалентов по отношению к соединению формулы IV.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт соединения формулы IV в условиях окисления дополнительно включает одно или более из гидрокарбоната натрия, карбоната натрия и бромида натрия.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт соединения формулы IV в условиях окисления дополнительно включает компонент растворителя, содержащий дихлорметан.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что компонент растворителя дополнительно содержит воду.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанные условия окисления включают добавление трихлоризоциануровой кислоты к раствору, содержащему соединение формулы IV и ТЕМРО при температуре от 0 до 5°C.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное добавление трихлоризоциануровой кислоты включает добавление трихлоризоциануровой кислоты по меньшей мере двумя порциями.

13. Способ по пп.11, 12, отличающийся тем, что указанный раствор перемешивают после указанного добавления при температуре от 0 до 5°C в течение около 30 мин.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий, после упомянутого перемешивания, нагревание указанного раствора до температуры от 20 до 25°C в течение от около 1 до около 2 ч.

