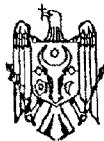




MD/EP 3746429 T2 2022.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3746429 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 401/04 (2006.01.01)  
C07D 213/61 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2020 1229</p> <p>(22) Data de depozit: 2019.01.29</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19705025.5, 2019.01.29</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3746429, 2020.12.09</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201862623664 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.01.30</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2022, 2022.08.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 10/2022, 2022.03.09</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2020, 2020.12.31</p>
<p>(71) Solicitant: INCYTE CORPORATION, US</p> <p>(72) Inventatori: WANG Dengjin, US; LIU Pingli, US; WU Yongzhong, US; ZHOU Jiacheng, US</p> <p>(73) Titular: INCYTE CORPORATION, US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>	

(54) Procedee pentru prepararea de (1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinil)piperidin-4-onă)

(57) Rezumat:

1

Această invenție se referă la procedee și intermediari pentru producerea de {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitril, util în tratamentul bolilor asociate cu activitatea

2

kinazelor Janus (JAK) incluzând tulburările inflamatorii, tulburările autoimune, cancerul, și alte boli.

Revendicări: 22

MD/EP 3746429 T2 2022.08.31

**(54) Processes for preparing (1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinyl)piperidine-4-one)**

**(57) Abstract:**

1

This invention relates to processes and intermediates for making {1-[3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinyl]piperidin-4-yl}-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl]azetidin-3-yl}acetonitrile, useful in the treatment of diseases related to the activity of Janus kinases (JAK) including inflammatory disorders, autoimmune disorders, cancer, and other diseases. The

2

invention is specifically directed to processes for making the intermediate (1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinyl)piperidine-4-one) from 1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl chloride and 4-hydroxypiperidine or 4-piperidone as well as to the intermediate 1-(3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl chloride.

Claims: 22

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL TEHNIC**

5 Această invenție se referă la procedee și intermediari pentru fabricarea de {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitril, util în tratamentul bolilor care au legătură cu activitatea kinazelor Janus (JAK) incluzând tulburări inflamatorii, tulburări autoimune, cancer, și alte boli.

**FUNDAL**

10 Protein kinazele (PK) reglează diverse procese biologice incluzând creșterea celulei, supraviețuirea, diferențierea, formarea organului, morfogeneza, neovascularizarea, repararea țesutului, și regenerarea, printre altele. Protein kinazele joacă de asemenea roluri specializate într-o serie de boli umane inclusiv cancerul. Citokinele, polipeptide sau glicoproteine cu masă moleculară scăzută, reglează multe căi implicate în răspunsul inflamator al gazdei la septicemie. Citokinele influențează diferențierea  
15 celulară, proliferarea și activarea, și pot modula atât răspunsurile proinflamatorii cât și răspunsurile antiinflamatorii pentru a permite gazdei să reacționeze adecvat la patogeni. Semnalizarea unui interval larg de citokine implică familia de kinaze Janus (JAK-uri) de protein tirozin kinaze și traductoare de semnal și activatoare de transcripție (STAT-uri). Există patru JAK-uri de mamifer cunoscute: JAK1 (Kinază Janus-1), JAK2, JAK3 (cunoscute de asemenea ca Kinază Janus, leucocită; JAKL; și L-JAK), și TYK2 (protein-tirozin kinază 2).

Răspunsurile imune și inflamatorii stimulate de citokine contribuie la patogeneza bolilor: patologii cum ar fi imunodeficiența combinată severă (SCID) apar din supresia sistemului imunitar, în timp ce un răspuns imun/inflamator hiperactiv sau necorespunzător contribuie la patologia bolilor autoimune (de exemplu, astm, lupus eritematos sistemic, tiroidită, miocardită) și boli cum ar fi  
25 sclerodermia și osteoartrita (Ortmann, R. A., T. Cheng, și colab. (2000) Arthritis Res 2(1): 16-32).

Deficiențele în expresia JAK-urilor sunt asociate cu multe stări de boală. De exemplu, șoarecii Jak1-/- sunt răniți la naștere, nu pot alăpta, și mor perinatal (Rodig, S. J., M. A. Meraz, și colab. (1998) Cell 93(3): 373-83). Embrionii de șoareci Jak2-/-sunt anemici și mor în jurul zilei 12,5 postcoitum din cauza absenței eritropoiezei definitive.

30 Calea JAK/STAT, și în particular toate cele patru JAK-uri, se crede că joacă un rol în patogeneza răspunsului astmatic, bolii pulmonare obstructive cronice, bronșitei, și altor boli inflamatorii înrudite ale tractului respirator inferior. Mai multe citokine care semnalizează prin JAK-uri au fost legate de bolile inflamatorii/afecțiunile tractului respirator superior, cum ar fi cele care afectează nasul și sinusurile (de exemplu, rinită și sinuzită) indiferent dacă există reacții alergice clasice sau nu. Calea  
35 JAK/STAT a fost de asemenea implicată în boli inflamatorii/afecțiuni ale ochiului și în răspunsuri alergice cronice.

Activarea de JAK/STAT în cancer poate avea loc prin stimularea citokinelor (de exemplu IL-6 sau GM-CSF) sau printr-o reducere în supresorii endogeni ai semnalizării JAK cum ar fi SOCS (supresor sau semnalizare cu citokine) sau PIAS (inhibitor de proteină al STAT activat) (Boudny, V., și Kovarik, J., Neoplasia. 49:349-355, 2002). Activarea semnalizării STAT, ca și alte căi în aval de JAK-uri (de exemplu, Akt), au fost corelate cu prognoza slabă în multe tipuri de cancer (Bowman, T., și colab. Oncogene 19:2474-2488, 2000). Nivelurile ridicate de citokine în circulație care semnalizează prin JAK/STAT joacă un rol causal în cașexie și/sau oboseala cronică. Ca atare, inhibarea JAK poate fi  
40 benefică la pacienții cu cancer din motive care se extind dincolo de potențiala activitate anti-tumorală.

Tirozin kinaza JAK2 poate fi benefică pentru pacienții cu tulburări mieloproliferative, de exemplu, policitemia vera (PV), trombocitemie esențială (ET), metaplazie mieloidă cu mielofibroză (MMM) (Levin, și colab., Cancer Cell, vol. 7, 2005: 387-397). Inhibarea kinazei JAK2V617F scade proliferarea celulelor hematopoietice, sugerând JAK2 ca potențială țintă pentru inhibarea farmacologică la pacienții cu PV, ET, și MMM.

50 De inhibarea de JAK-uri pot beneficia pacienții care suferă de tulburări imunitare ale pielii cum ar fi psoriazis, și sensibilizarea pielii. Se crede că întreținerea psoriazisului depinde de un număr de citokine inflamatorii în plus față de diferite chemokine și factori de creștere (JCI, 113:1664-1675), dintre care multe semnalizează prin JAK-uri (Adv Pharmacol. 2000;47:113-74).

JAK1 joacă un rol central într-un număr de citokine și căi de semnalizare ale factorului de creștere care, când este dereglat, poate conduce la, sau contribui la stări de boală. De exemplu, nivelurile IL-6 sunt ridicate în artrita reumatoidă, o boală în care s-a sugerat că ar avea efecte  
55 detrimentale (Fonesca, J.E. și colab., Autoimmunity Reviews, 8:538-42, 2009). Datorită semnalelor IL-6, cel puțin parțial, prin JAK1, antagonizarea IL-6 direct sau indirect prin inhibarea JAK1 este de așteptat să furnizeze beneficiu clinic (Guschin, D., N., și colab Embo J 14:1421, 1995; Smolen, J. S., și colab. Lancet 371:987, 2008). Mai mult, în unele cancere JAK1 este mutant conducând la creșterea și  
60

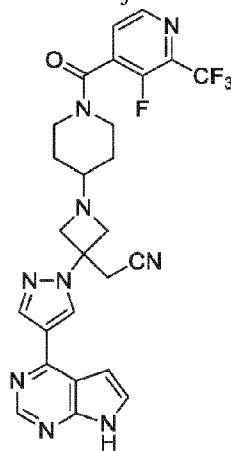
supraviețuirea celulelor tumorale constitutive nedorite (Mullighan CG, Proc Natl Acad Sci U S A, 106:9414-8, 2009; Flex E., și colab. J Exp Med. 205:751-8, 2008). În alte boli autoimune și cancere, nivelurile sistemice ridicate ale citokinelor inflamatorii care activează JAK1 pot contribui de asemenea la boala și/sau simptomele asociate. Prin urmare, pacienții cu astfel de boli pot beneficia de inhibarea JAK1. Inhibitorii selectivi ai JAK1 pot fi eficienți în timp ce se evită efectele inutile și potențial nedorite ale inhibării altor kinaze JAK.

Inhibitorii selectivi ai JAK1, față de alte kinaze JAK, pot avea multiple avantaje terapeutice față de inhibitorii mai puțin selectivi. Cu privire la selectivitatea împotriva JAK2, un număr de citokine și factori de creștere importanți semnalizează prin JAK2 incluzând, de exemplu, eritropoietină (Epo) și trombopoietină (Tpo) (Parganas E, și colab. Cell. 93:385-95, 1998). Epo este un factor de creștere cheie pentru producerea de celule roșii sanguine; prin urmare o lipsă a semnalizării dependente de Epo poate conduce la numere reduse de celule roșii sanguine și la anemie (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Tpo, un alt exemplu al unui factor de creștere dependent de JAK2, joacă un rol central în controlarea proliferării și maturării megakariocitelor - celule din care sunt produse trombocitele (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Ca atare, semnalizarea Tpo redusă ar scăde numărul de megakariocite (megakariocitopenie) și ar scăde numărul de trombocite în circulație (trombocitopenie). Acest lucru poate conduce la sângerare nedorită și/sau necontrolabilă. Reducerea inhibării altor JAK-uri, cum ar fi JAK3 și Tyk2, poate fi de asemenea de dorit deoarece s-a arătat că oamenii cărora le lipsește versiunea funcțională a acestor kinaze suferă de numeroase maladii cum ar fi imunodeficiența combinată sever sau sindromul hiperimmunoglobuliniei E (Minegishi, Y, și colab. Immunity 25:745-55, 2006; Macchi P, și colab. Nature. 377:65-8, 1995). Prin urmare un inhibitor JAK1 cu afinitate redusă pentru alte JAK-uri ar avea avantaje semnificative față de un inhibitor mai puțin selectiv în ceea ce privește efectele secundare reduse care implică imunosupresia, anemia și trombocitopenia.

Datorită utilității inhibitorilor JAK, există o necesitate pentru dezvoltarea de noi procedee pentru fabricarea inhibitorilor JAK. Această invenție este direcționată către această necesitate și altele.

#### REZUMAT

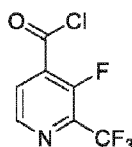
Inhibitorii JAK sunt descriși în US 2011/0224190, incluzând {1-([1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il]-3-[4-(7H-pirolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitril, care este reprezentat mai jos cu Formula I.



I

Prezenta invenție furnizează, *inter alia*, procedee și intermediari pentru fabricarea compusului cu Formula I.

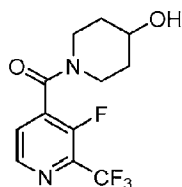
În particular, prezenta invenție furnizează un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:



III

sau a unei săruri a acestuia, cu 4-hidroxipiperidină pentru a forma un compus cu Formula IV:

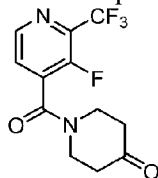
5



IV

sau o sare a acestuia.

Procedeele descrise aici pot cuprinde suplimentar punerea în reacție a unui compus cu Formula IV, sau a unei săruri a acestuia, sub condiții de oxidare pentru a forma un compus cu Formula V:



V

5

sau o sare a acestuia.

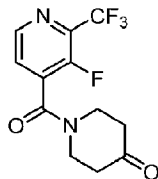
Prezenta invenție furnizează de asemenea un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:



III

10

sau a unei săruri a acestuia, cu 4-piperidonă, sau o sare a acesteia, pentru a forma un compus cu Formula V:

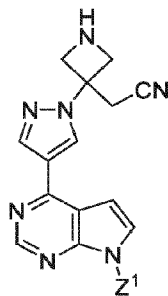


V

sau o sare a acestuia.

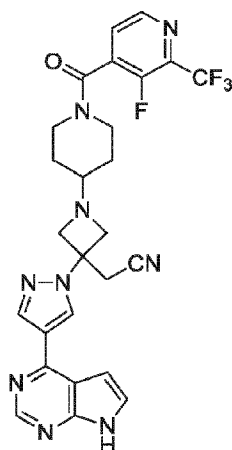
15

În unele realizări, procedeele descrise aici cuprind suplimentar punerea în reacție a unui compus cu Formula V cu un compus cu Formula VI:



VI

sau o sare a acestuia, în prezența unui agent reducător, pentru a forma un compus cu Formula I:



I

sau o sare a acestuia;

în care  $Z^1$  este H sau o grupare de protecție.

### DESCRIERE DETALIATĂ

5 Se apreciază că anumite caracteristici ale invenției, care sunt, pentru claritate, descrise în contextul realizărilor separate, pot fi de asemenea furnizate în combinație într-o singură realizare. Invers, diferite caracteristici ale invenției care sunt, pentru concizie, descrise în contextul unei singure realizări, pot fi de asemenea furnizate separat sau în orice subcombinație adecvată.

10 Procedeele descrise aici pot fi monitorizate în conformitate cu orice metodă adecvată cunoscută în domeniu. De exemplu, formarea produsului poate fi monitorizată prin mijloace spectroscopice, cum ar fi spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (de exemplu,  $^1\text{H}$  sau  $^{13}\text{C}$ ), spectroscopia cu infraroșii, sau spectrofotometria (de exemplu, UV-vizibil); sau prin cromatografie cum ar fi cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) sau cromatografia în strat subțire (TLC) sau alte tehnici înrudite.

15 Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „punere în reacție” este utilizat așa cum este cunoscut în domeniu și se referă în general la aducerea împreună a reactivilor chimici într-o astfel de manieră astfel încât să permită interacțiunea lor la nivel molecular pentru a obține o transformare chimică sau fizică. În unele realizări, punerea în reacție implică doi reactivi, în care unul sau mai mulți echivalenți ai celui de al doilea reactiv sunt utilizați față de primul reactiv. Etapele de punere în reacție  
20 ale procedeele descrise aici pot fi efectuate pentru un timp și în condiții adecvate pentru prepararea produsului identificat.

Prepararea compușilor poate implica protejarea și deprotejarea diferitelor grupări chimice. Necesitatea de protejare și deprotejare, și selecția grupărilor de protecție adecvate pot fi cu ușurință determinate de către o persoană calificată în domeniu. Chimia grupărilor de protecție poate fi găsită, de  
25 exemplu, în Greene, și colab., Protective Groups in Organic Synthesis, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007. Ajustările la grupările de protecție și metodele de formare și clivare descrise aici pot fi ajustate după cum este necesar în lumina diferiților substituenți.

30 Reacțiile din procedeele descrise aici pot fi efectuate în solvenți adecvați care pot fi cu ușurință selectați de către o persoană calificată în domeniul de sinteză organică. Solvenții adecvați pot fi substanțial nereactivi cu materiile prime (reactanți), intermediarii, sau produsele la temperaturile la care sunt efectuate reacțiile, de exemplu, temperaturi care pot varia de la temperatura de congelare a solventului la temperatura de topire a solventului. O reacție dată poate fi efectuată într-un solvent sau într-un amestec de mai mult de un solvent. Depinzând de etapa de reacție particulară, pot fi selectați  
35 solvenții adecvați pentru o anumită etapă de reacție. În unele realizări, reacțiile pot fi efectuate în absența solventului, cum ar fi când cel puțin unul din reactivi este un lichid sau gaz.

Solvenții adecvați pot include solvenți halogenați cum ar fi tetraclorura de carbon, bromodichlorometan, dibromoclorometan, bromoform, cloroform, bromoclorometan, dibromometan, clorură de butil, dichlorometan, tetracloroetilen, trichloroetilen, 1,1,1-trichloroetan, 1,1,2-trichloroetan, 1,1-dichloroetan, 2-cloropropan,  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorotoluen, 1,2-dichloroetan, 1,2-dibromoetan, hexafluorobenzen,  
40 1,2,4-trichlorobenzen, 1,2-dichlorobenzen, clorobenzen, fluorobenzen, amestecuri ale acestora și altele asemenea.

Solvenții eter adecvați includ: dimetoximetan, tetrahidrofuran, 1,3-dioxan, 1,4-dioxan, furan, dietil eter, etilen glicol dimetil eter, etilen glicol dietil eter, dietilen glicol dimetil eter, dietilen glicol dietil eter, trietilen glicol dimetil eter, anisol, t-butil metil eter, amestecuri ale acestora și altele  
45 asemenea.

Solvenții protici adecvați pot include, cu titlu de exemplu și fără limitare, apă, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilen glicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, i-butil alcool, t-butil alcool, 2-etoxietanol, dietilen glicol, 1-, 2-, sau 3-pentanol, neo-pentil alcool, t-pentil alcool, dietilen glicol monometil eter, dietilen glicol monoetil eter, ciclohexanol, alcool benzilic, fenol, sau glicerol.

Solvenții aprotici adecvați pot include, cu titlu de exemplu și fără limitare, tetrahidrofuran (THF), N,N-dimetilformamidă (DMF), N,N-dimetilacetamidă (DMA), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinonă (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinonă (DMI), N-metilpirolidinonă (NMP), formamidă, N-metilacetamidă, N-metilformamidă, acetonitril, dimetil sulfoxid, propionitril, etil format, macetat de etil, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetat de etil, sulfolan, N,N-dimetilpropionamidă, tetrametiluree, nitrometan, nitrobenzen, sau hexametilfosforamidă.

Solvenții hidrocarbură adecvați includ benzen, ciclohexan, pentan, hexan, toluen, cicloheptan, metilciclohexan, heptan, etilbenzen, m-, o-, sau p-xilen, octan, indan, nonan, sau naftalenă.

Reacțiile din procedeele descrise aici pot fi efectuate la temperaturi adecvate care pot fi cu ușurință determinate de către specialistul calificat. Temperaturile de reacție vor depinde de, de exemplu, punctele de topire și de fierbere ale reactivilor și solvenților, dacă sunt prezenți; termodinamicele reacției (de exemplu, reacțiile exotermice viguroase pot necesita să fie efectuate la temperaturi reduse); și cineticele de reacție (de exemplu, o barieră cu energie de activare ridicată poate necesita temperaturi ridicate). „Temperatura ridicată” se referă la o temperatură peste temperatura camerei (aproximativ 22°C).

Reacțiile procedeele descrise aici pot fi efectuate în aer sau sub o atmosferă inertă. De obicei, reacțiile care conțin reactivi sau produse care sunt substanțial reactive cu aerul pot fi efectuate utilizând tehnici sintetice sensibile la aer care sunt bine cunoscute specialistului calificat.

În unele realizări, prepararea compușilor poate implica adăugarea de acizi sau baze pentru a afecta, de exemplu, catalizarea unei reacții dorite sau formarea de forme de sare cum ar fi sărurile de adiție cu acid.

Exemple de acizi pot fi acizii anorganici sau organici. Acizii anorganici includ acid clorhidric, acid bromhidric, acid sulfuric, acid fosforic, și acid azotic. Acizii organici includ acid formic, acid acetic, acid propionic, acid butanoic, acid benzoic, acid 4-nitrobenzoic, acid metansulfonic, acid p-toluensulfonic, acid benzensulfonic, acid tartric, acid trifluoroacetic, acid propiolic, acid butiric, acid 2-butanoic, acid vinil acetic, acid pentanoic, acid hexanoic, acid heptanoic, acid octanoic, acid nonanoic și acid decanoic.

Exemple de baze includ hidroxid de litiu, hidroxid de sodiu, hidroxid de potasiu, carbonat de litiu, carbonat de sodiu, carbonat de potasiu, și bicarbonat de sodiu. Unele exemple de baze puternice includ, dar nu sunt limitate la, hidroxid, alcoxizi, amide metalice, hidride metalice, dialchilamide metalice și arilamine, în care; alcoxizii includ săruri de litiu, sodiu și potasiu de oxizi de metil, etil și t-butil; amidele metalice includ amidă de sodiu, amidă de potasiu, și amidă de litiu; hidridele metalice includ hidrură de sodiu, hidrură de potasiu și hidrură de litiu; și dialchilamidele metalice includ săruri de sodiu și potasiu de amide substituie de metil, etil, n-propil, i-propil, n-butil, t-butil, trimetilsilil și ciclohexil.

Intermediarii și produsele pot include de asemenea sărurile compușilor divulgați aici. Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „sare” se referă la o sare formată prin adăugarea unui acid sau bază acceptabile la un compus divulgat aici. În unele realizări, sărurile sunt săruri acceptabile farmaceutic. Așa cum s-a utilizat în acest document, exprimarea „acceptabilă farmaceutic” se referă la o substanță care este acceptabilă pentru utilizare în aplicații farmaceutice dintr-o perspectivă toxicologică și nu interacționează advers cu ingredientul activ. Sărurile acceptabile farmaceutic, incluzând săruri mono- și bi-, le includ, dar nu sunt limitate la, pe cele derivate din acizi organici și anorganici cum ar fi, dar fără a se limita la, acizii acetic, lactic, citric, cinnamic, tartric, succinic, fumaric, maleic, malonic, mandelic, malic, oxalic, propionic, clorhidric, bromhidric, fosforic, nitric, sulfuric, glicolic, piruvic, metansulfonic, etansulfonic, toluensulfonic, salicilic, benzoic, și acizi acceptabili cunoscuți în mod similar. Liste de săruri adecvate sunt găsite în Remington's Pharmaceutical Sciences, ed. a 17-a, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pag. 1418 și Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

După efectuarea preparării compușilor în conformitate cu procedeele descrise aici, operațiunile de izolare și purificare uzuale cum ar fi concentrarea, filtrarea, extragerea, extragerea fazei solide, recristalizarea, cromatografia, și altele asemenea poate fi utilizate, pentru a izola produsul dorit.

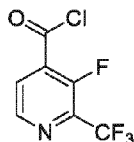
În unele realizări, compușii descriși aici și sărurile acestora, sunt substanțial izolate. Prin „substanțial izolat” se înțelege că compusul este cel puțin parțial sau substanțial separat din mediul în care el a fost format sau detectat. Separarea parțială poate include, de exemplu, o compoziție îmbogățită în compusul invenției. Separarea substanțială poate include compoziții conținând cel puțin aproximativ 50%, cel puțin aproximativ 60%, cel puțin aproximativ 70%, cel puțin aproximativ 80%, cel puțin aproximativ 90%, cel puțin aproximativ 95%, cel puțin aproximativ 97%, sau cel puțin aproximativ

99% din masa compusului invenției, sau o sare a acestuia. Metodele pentru izolarea compușilor și sărurilor lor sunt de rutină în domeniu.

5 Procdeele pentru prepararea unora din intermediari pot fi găsite în brevetul S.U.A. nr. 8.987.443, publicat pe 24 martie 2015; brevetul S.U.A. nr. 9.487.521, publicat pe 8 noiembrie 2016; brevetul S.U.A. nr. 8.410.265, publicat pe 2 aprilie 2013, și brevetul S.U.A. nr. 8.765.734, publicat pe 1 iulie 2014.

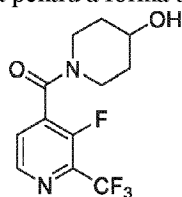
**Procdeee și intermediari**

10 Prezenta invenție furnizează, *inter alia*, procdeee și intermediari pentru fabricarea compusului cu Formula I. Corespunzător, într-un aspect, este furnizat aici un procdeeu, cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:



III

sau o sare a acestuia, cu 4-hidroxipiperidină pentru a forma un compus cu Formula IV:



IV

sau o sare a acestuia.

15 În unele realizări, punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidină este efectuată în prezența unei baze.

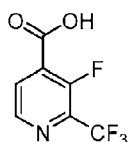
În unele realizări, baza este o amină terțiară.

În unele realizări, amina terțiară este *N,N*-diizopropiletilamină.

20 În unele realizări, punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidina este efectuată într-o componentă solvent care cuprinde diclorometan.

În unele realizări, punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidina este efectuată la o temperatură de la aproximativ 25°C până la aproximativ 35°C.

În unele realizări, compusul cu Formula III este format printr-un procdeeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula II:



II

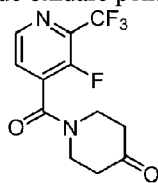
25 sau a unei săruri a acestuia, cu clorura de oxalil pentru a forma compusul cu Formula III, sau o sare a acestuia.

30 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorură de oxalil este efectuată în prezența unei cantități catalitice de dimetil formamidă (DMF). În unele realizări, DMF este prezentă între aproximativ 0,01 și aproximativ 0,03 echivalenți molari față de compusul cu Formula II.

În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată într-o componentă solvent care cuprinde diclorometan.

În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată la o temperatură de la aproximativ 15°C până la aproximativ 25°C.

35 Procdeele descrise aici pot cuprinde suplimentar punerea în reacție a unui compus cu Formula IV, sau a unei săruri a acestuia, sub condiții de oxidare pentru a forma un compus cu Formula V:



V

sau o sare a acestuia.

În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind cel puțin un agent de oxidare (adică, un prim agent de oxidare). În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind un al doilea agent de oxidare.

5 În unele realizări, agentul de oxidare este acidul tricloroisocianuric (TCIC). În unele realizări, TCIC este prezent între aproximativ 0,5 și aproximativ 0,7 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV.

10 În unele realizări, agentul de oxidare este 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO). În unele realizări, TEMPO este prezent între aproximativ 0,005 și aproximativ 0,05 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, TEMPO este prezent între aproximativ 0,015 și aproximativ 0,025 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, TEMPO este prezent la aproximativ 0,020 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV.

15 În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind cel puțin TCIC (un prim agent de oxidare) și TEMPO (un al doilea agent de oxidare). În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind o bromură metalică, de exemplu, bromură de sodiu. În unele realizări, bromura de sodiu este prezentă între aproximativ 0,005 și aproximativ 0,015 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, bromura de sodiu este prezentă la aproximativ 0,01 echivalenți față de compusul cu Formula IV.

20 În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind suplimentar o bază. În unele realizări, baza este bicarbonat de sodiu și/sau carbonat de sodiu. În unele realizări, bicarbonatul de sodiu este prezent între aproximativ 1 și aproximativ 10 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, bicarbonatul de sodiu este prezent la aproximativ 5 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, carbonatul de sodiu este prezent între aproximativ 0,1 și aproximativ 1 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV. În unele realizări, carbonatul de sodiu este prezent la aproximativ 0,5 echivalenți molari față de compusul cu Formula IV.

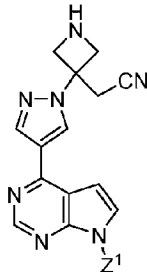
25 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula IV sub condiții de oxidare cuprinde în plus unul sau mai mulți dintre bicarbonat de sodiu, carbonat de sodiu, și bromură de sodiu. În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula IV sub condiții de oxidare cuprinde în plus bicarbonat de sodiu, carbonat de sodiu, și bromură de sodiu.

30 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula IV sub condiții de oxidare cuprinde în plus o componentă solvent cuprinzând diclorometan. În unele realizări, componenta solvent cuprinde în plus apă.

35 În unele realizări, condițiile de oxidare cuprind adăugarea de acid tricloroisocianuric (TCIC) la o soluție cuprinzând compusul cu Formula IV și TEMPO la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C. În unele realizări, adăugarea de acid tricloroisocianuric cuprinde adăugarea acidului tricloroisocianuric în cel puțin două porții. În unele realizări, soluția este agitată după respectiva adăugare la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C timp de aproximativ 30 min. În unele realizări, procedeul cuprinde în plus, după respectiva agitare, încălzirea respectivei soluții până la o temperatură de la aproximativ 20°C până la aproximativ 25°C timp de aproximativ o oră până la aproximativ două ore.

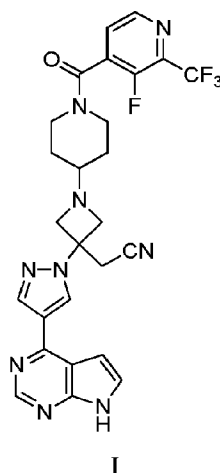
40 În unele realizări, condițiile de oxidare conduc la compusul cu Formula V având o puritate de mai mare de aproximativ 99%.

În unele realizări, procedeele descrise aici cuprind suplimentar punerea în reacție a unui compus cu Formula V cu un compus cu Formula VI:



VI

45 sau cu o sare a acestuia, în prezența unui agent reducător, pentru a forma un compus cu Formula I:



sau o sare a acestuia;

în care  $Z^1$  este H sau o grupare de protecție.

În unele realizări,  $Z^1$  este H.

5 În unele realizări, agentul reducător este cianoborohidruță de sodiu sau triacetoxiborohidruță de sodiu. În unele realizări, agentul reducător este triacetoxiborohidruță de sodiu. În unele realizări, este utilizat mai mult de 1 echivalent (de exemplu, 2 echivalenți) de triacetoxiborohidruță de sodiu pe baza compusului cu Formula VI.

10 Agentul reducător poate fi orice agent reducător adecvat pentru utilizare în aminarea reductivă, incluzând diferiți agenți reducători borohidruți și borani, cum ar fi cei din Ellen W. Baxter și Allen B. Reitz, Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents, Organic Reactions, Capitolul 1, paginile 1-57 (Wiley, 2002). Clase nelimitative de agenți reducători adecvați includ borohidruți, cianoborohidruți, tri(acil  $C_{1-4}$ )oxiborohidruți (de exemplu, derivați de triacetoxiborohidruți), hidruță 9-borobiciclo[3,3,1]nonan, tri(alchil  $C_{1-4}$ ) borohidruță, și derivați disopinocampteilcianoborohidruți, amino borani, complex boran-piridină, și borani de alchilamină. Exemple nelimitative de agenți reducători adecvați includ cianoborohidruța de sodiu, triacetoxiborohidruța de sodiu, hidruța ciano-9-borobiciclo[3,3,1]nonan de sodiu, cianoborohidruță de tetrabutilamoniu, cianoborohidruță pe un suport solid, triacetoxiborohidruță de tetrametilamoniu, triacetoxiborohidruță de sodiu, trietilborohidruță de litiu, tri(sec-butil)borohidruță de litiu, disopinocampteilcianoborohidruță de sodiu, catecol boran, boran tetrahidrofuran, borohidruță de sodiu, borohidruță de potasiu, borohidruță de litiu, paladiu în prezența gazului de hidrogen, 5-etil-2-metilpiridină boran (PEMB), 2-picolin boran sau triacetoxiborohidruță susținută de polimer. În unele realizări, oricare din anterior menționatele, și preferabil cianoborohidruța de sodiu, este utilizată în combinație cu un aditiv de titan (IV), agent de dehidratare, sau un aditiv de halogenură de zinc. În unele realizări, agentul reducător este o cianoborohidruță sau triacetoxiborohidruță de tetra(alchil  $C_{1-4}$ )amoniu, o cianoborohidruță sau triacetoxiborohidruță de metal alcalin, sau o cianoborohidruță sau triacetoxiborohidruță de alcalin pământos. În unele realizări, agentul reducător este o cianoborohidruță de metal alcalin. În unele realizări, agentul reducător este selectat dintre cianoborohidruță de sodiu și triacetoxiborohidruță de sodiu. În unele realizări, agentul reducător este triacetoxiborohidruță de sodiu. Așa cum s-a utilizat în acest document, un aditiv de titan (IV) este un acid Lewis conținând un metal de titan (IV) (de exemplu, tetraclorură de titan, izopropoxid de titan, etoxid de titan, și altele asemenea).

35 În unele realizări, compusul cu Formula VI, sau sarea acestuia, este sare diclorhidrat de 2-(3-(4-(7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetid-3-il) acetoneitiril. În unele realizări, punerea în reacție este efectuată în prezența a cel puțin doi echivalenți ai unei a doua baze. În unele realizări, a doua bază este o amină terțiară (de exemplu, trietilamină). Așa cum s-a utilizat în acest document, „a doua” în exprimarea „a doua bază” este utilizat pentru a diferenția baza de alte baze utilizate în etapele anterioare sau ulterioare ale procedurii și nu pentru a indica că trebuie să fie prezente două baze.

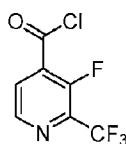
În unele realizări, mai mult de 1 echivalent al compusului cu Formula V este utilizat pe baza compusului cu Formula VI, sau a sării acestuia.

40 În unele realizări, reacția dintre un compus cu Formula VI, sau sare a acestuia, cu un compus cu Formula V este efectuată în solvent de diclorometan.

În unele realizări, procedeul cuprinde în plus punerea în reacție a unui compus cu Formula I cu acidul adipic pentru a forma sarea adipat a compusului cu Formula I.

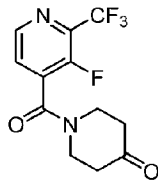
45 Într-un alt aspect, este furnizat aici un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:

11



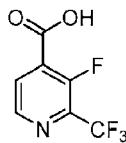
III

sau a unei săruri a acestuia, cu 4-piperidona, sau o sare a acesteia, pentru a forma un compus cu Formula V:



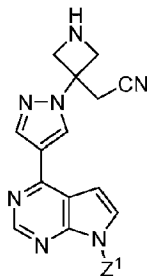
V

- 5 sau o sare a acestuia.  
 În unele realizări, 4-piperidona, sau o sare a acesteia, este clorhidratul de 4-piperidonă. În unele realizări, 4-piperidona, sau o sare a acesteia, este clorhidratul monohidrat de 4-piperidonă.  
 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona cuprinde în plus o bază. În unele realizări, baza este carbonat de sodiu.  
 10 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona este efectuată într-o componentă solvent care cuprinde diclorometan.  
 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona este efectuată la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C.  
 15 În unele realizări, compusul cu Formula III este format printr-un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula II:



II

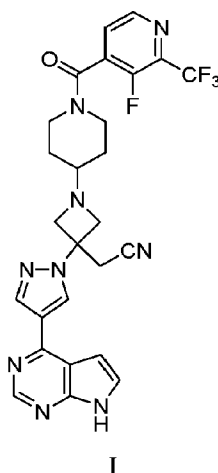
- sau a unei săruri a acestuia, cu clorură de oxalil pentru a forma compusul cu Formula III, sau o sare a acestuia.  
 20 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată în prezența unei cantități catalitice de dimetil formamidă (DMF). În unele realizări, DMF este prezentă între aproximativ 0,01 și aproximativ 0,03 echivalenți molari față de compusul cu Formula II.  
 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată într-o componentă solvent cuprinzând diclorometan.  
 25 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată la o temperatură de la aproximativ 15°C până la aproximativ 25°C.  
 În unele realizări, compusul cu Formula III nu este izolat înainte de punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona.  
 În unele realizări, punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil și punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona sunt efectuate într-un singur reactor.  
 30 În unele realizări, procedeul descris aici cuprinde suplimentar punerea în reacție a unui compus cu Formula V cu un compus cu Formula VI:



VI

sau o sare a acestuia, în prezența unui agent reducător, pentru a forma un compus cu Formula I:

12



sau o sare a acestuia;

în care Z<sup>1</sup> este H sau o grupare de protecție.

În unele realizări, Z<sup>1</sup> este H.

5 În unele realizări, agentul reducător este cianoborohidruură de sodiu sau triacetoxiborohidruură de sodiu. În unele realizări, agentul reducător este triacetoxiborohidruură de sodiu. În unele realizări, mai mult de 1 echivalent (de exemplu, 2 echivalenți) de triacetoxiborohidruură de sodiu este utilizat pe baza compusului cu Formula VI.

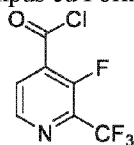
10 În unele realizări, compusul cu Formula VI, sau sarea acestuia, este sare diclorhidrat de 2-(3-(4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidin-3-il) acetonitril. În unele realizări, punerea în reacție este efectuată în prezența a cel puțin doi echivalenți ai unei a doua baze. În unele realizări, a doua bază este o amină terțiară (de exemplu, trietilamină).

În unele realizări, mai mult de 1 echivalent al compusului cu Formula V este utilizat pe baza compusului cu Formula VI, sau sării acestuia.

15 În unele realizări, reacția dintre un compus cu Formula VI, sau sare a acestuia, cu un compus cu Formula V este efectuată în solvent de diclorometan.

În unele realizări, procedeul cuprinde în plus punerea în reacție a unui compus cu Formula I cu acidul adipic pentru a forma sarea adipat a compusului cu Formula I.

Este de asemenea descris aici un compus cu Formula III care este un intermediar în procedeu:



III

20

sau o sare a acestuia.

### Utilizări

25 Compusul cu Formula I, {1-[1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil]piperidin-4-il]-3-[4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il} acetonitril, este un inhibitor al JAK (de exemplu, JAK1, JAK2). Inhibitorii JAK sunt utili în tratarea diferitelor boli sau tulburări asociate cu JAK. Exemple de boli asociate cu JAK includ boli care implică sistemul imunitar incluzând, de exemplu, respingerea transplantului de organ (de exemplu, respingerea alogrefei și boală greșă versus gazdă). Alte exemple de boli asociate cu JAK includ boli autoimune cum ar fi scleroză multiplă, artrită reumatoidă, artrită juvenilă, artrită psoriazică, diabet de tip I, lupus, psoriazis, boală inflamatorie intestinală, colită ulcerativă, boală Crohn, miastenia gravis, nefropatii imunoglobulinice, miocardită, tulburări de tiroidă autoimune, boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC), și altele asemenea. În unele realizări, boala autoimună este o tulburare autoimună buloasă a pielii cum ar fi pemfigus vulgaris (PV) sau pemfigoid bulos (BP).

35 Alte exemple de boli asociate cu JAK includ afecțiunile alergice cum ar fi astmul, alergiile alimentare, dermatita eczematosă, dermatita de contact, dermatita atopică (eczemă atropică), și rinită. Alte exemple de boli asociate cu JAK includ boli virale cum ar fi virusul Epstein Barr (EBV), hepatita B, hepatita C, HIV, HTLV 1, virusul Varicella-Zoster (VZV) și virusul Papilloma uman (HPV). Alte exemple de boli asociate cu JAK includ bolile asociate cu răsucirea cartilajului, de exemplu, artrită gutoasă, atrită septică sau infecțioasă, artrită reactivă, distrofie simpatetică de reflex, algodistrofie, 40 sindrom Tietze, atropatie costală, osteoartrită deformans endemica, boala Mseleni, boala Handigodu,

degenerarea care rezultă din fibromialgie, lupus eritematos sistemic, sclerodermie, sau spondilită anchilozantă.

Alte exemple de boli asociate cu JAK includ malformațiile cartilajului congenital, incluzând crondroliza ereditară, crondrodisplaziile, și pseudocrondrodisplaziile (de exemplu, microtia, enotia, și crondrodisplazia metafizeală).

Alte exemple de boli sau afecțiuni asociate cu JAK includ tulburări ale pielii cum ar fi psoriazis (de exemplu, psoriazis vulgaris), dermatită atopică, eczemă a pielii, iritare a pielii, sensibilizare a pielii (de exemplu, dermatită de contact sau dermatită de contact alergică). De exemplu, anumite substanțe incluzând unele farmaceutice când sunt aplicate topic pot cauza sensibilizarea pielii. În unele realizări, coadministrarea sau administrarea secvențială a cel puțin unui inhibitor al JAK al invenției împreună cu agentul care determină sensibilizarea nedorită poate fi de ajutor în tratarea unei astfel de sensibilizare sau dermatită nedorite. În unele realizări, tulburarea pielii este tratată prin administrarea topică a cel puțin unui inhibitor al JAK al invenției.

Alte exemple de boli sau afecțiuni asociate cu JAK le include pe cele caracterizate prin tumori solide (*de exemplu*, cancer la prostată, cancer renal, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer gastric, cancer la sân, cancer pulmonar, cancere de cap și gât, cancer la tiroidă, glioblastom, sarcom Kaposi, boală Castleman, leiomiiosarcom uterin, melanom etc.), cancer hematologic (de exemplu, limfom, leucemie cum ar fi leucemie limfoblastică acută (ALL), leucemie mielogenă acută (AML) sau mielom multiplu), și cancer la piele cum ar fi limfom cutanat cu celule T (CTCL) și limfom cutanat cu celule B. Exemple de CTCL-uri includ sindrom Sezary și micoză fungoidă. Alte exemple de boli sau afecțiuni asociate cu JAK includ hipertensiunea arterială pulmonară.

Alte exemple de boli sau afecțiuni asociate cu JAK includ cancerul asociat cu inflamația. În unele realizări, cancerul este asociat cu boala inflamatorie intestinală. În unele realizări, boala inflamatorie intestinală este colită ulcerativă. În unele realizări, boala inflamatorie intestinală este boală Crohn. În unele realizări, cancerul asociat cu inflamația este cancer asociat cu colita. În unele realizări, cancerul asociat cu inflamația este cancer la colon sau cancer colorectal. În unele realizări, cancerul este cancer gastric, tumoare carcinoidă gastrointestinală, tumoare stromală gastrointestinală (GIST), adenocarcinom, cancer la intestinul subțire, sau cancer rectal.

Bolile asociate cu JAK le pot include în plus pe cele caracterizate prin expresia de: mutații JAK2 cum ar fi acelea având cel puțin o mutație în domeniul pseudo-kinază (*de exemplu*, JAK2V617F); mutații JAK2 având cel puțin o mutație exterioră a domeniului pseudo-kinază; mutații JAK1; mutații JAK3; mutații ai receptorului de eritropoietină (EPOR); sau expresia dereglată a CRLF2.

Bolile asociate cu JAK pot include în plus tulburări mieloproliferative (MPD-uri) cum ar fi policitemia vera (PV), trombocitemie esențială (ET), mielofibroză cu metaplazie mieloidică (MMM), mielofibroză primară (PMF), leucemie mielogenă cronică (CML), leucemie mielomonocitară cronică (CMML), sindrom hipereozinofilic (HES), mastocitoză sistemică (SMCD), și altele asemenea. În unele realizări, tulburarea mieloproliferativă este mielofibroză (de exemplu, mielofibroză primară (PMF) sau post policitemia vera/mielofibroză cu trombocitemie esențială (Post-PV/Post-ET MF)). În unele realizări, tulburarea mieloproliferativă este mielofibroză cu post- trombocitemie esențială (Post-ET MF). În unele realizări, tulburarea mieloproliferativă este mielofibroză cu post policitemia vera (Post-PV MF).

Alte exemple de boli sau afecțiuni asociate cu JAK includ ameliorarea efectelor secundare dermatologice ale altor farmaceutice prin administrarea compusului invenției. De exemplu, numeroși agenți farmaceutici conduc la reacții alergice nedorite care se pot manifesta ca iritație acneiformă sau dermatită înrudită. Exemple de agenți farmaceutici care au astfel de efecte secundare nedorite includ medicamentele contra cancerului cum ar fi gefitinib, cetuximab, erlotinib, și altele asemenea. Compușii invenției pot fi administrați sistemic sau topic (de exemplu, localizați în vecinătatea dermatitei) în combinație cu (de exemplu, simultan sau secvențial) agentul farmaceutic care are efectul secundar dermatologic nedorit. În unele realizări, compusul invenției poate fi administrat topic împreună cu unul sau mai multe alte farmaceutice, unde celelalte farmaceutice când sunt aplicate topic în absența unui compus al invenției cauzează dermatită de contact, sensibilizare alergică de contact, sau tulburări similare ale pielii. Corespunzător, compozițiile invenției includ formulări topice care conțin compusul invenției și un agent farmaceutic suplimentar care poate cauza dermatită, tulburări ale pielii, sau efecte secundare înrudite.

Alte boli asociate cu JAK includ inflamația și bolile inflamatorii. Exemple de boli inflamatorii includ sarcoidoză, boli inflamatorii ale ochiului (de exemplu, irită, uveită, sclerită, conjunctivită, sau boli înrudite), boli inflamatorii ale tractului respirator (de exemplu, ale tractului respirator superior incluzând nasul și sinusurile cum ar fi rinită sau sinuzită sau ale tractului respirator inferior incluzând bronșită, boală pulmonară obstructivă cronică, și altele asemenea), miopatie inflamatorie cum ar fi miocardită, și alte boli inflamatorii. În unele realizări, boala inflamatorie a ochiului este blefarita.

Alte boli asociate cu JAK includ ischemie - leziuni de reperfuzie sau o boală sau afecțiune asociată cu un eveniment ischemic inflamator cum ar fi accidentul vascular cerebral sau stopul cardiac, starea de boală indusă de endotoxină (de exemplu, complicații după chirurgia de bypass sau stări de endotoxină cronică care contribuie la insuficiență cardiacă cronică), anorexia, cașexie, oboseală cum ar fi cea care rezultă din, sau este asociate cu cancer, restenoză, sclerodermie, fibroză, afecțiuni asociate cu hipoxia sau astroglioza cum ar fi, de exemplu, retinopatia diabetică, cancerul, sau neurodegenerarea, și alte boli inflamatorii cum ar fi sindromul răspunsului inflamator sistemic (SIRS) și șocul septic. Alte boli asociate cu JAK includ guta și dimensiunea crescută a prostatei datorată, de exemplu, hipertrofiei benigne a prostatei sau hiperplaziei prostatice benigne, precum și boli de resorbție osoasă cum ar fi osteoporoza sau osteoartrita, boli de resorbție osoasă asociate cu: dezechilibrul hormonal și/sau terapia hormonală, boala autoimună (de exemplu sarcoidoza osoasă), sau cancerul (de exemplu mielom).

Alte boli asociate cu JAK includ o tulburare a ochiului uscat. Așa cum s-a utilizat în acest document, „tulburarea ochiului uscat” este intenționată să cuprindă stările de boală rezumate într-un recent raport oficial al Seminarului Ochiului Uscat (DEWS), care a definit ochiul uscat ca „o boală multifactorială a lacrimilor și suprafeței oculare care conduce la simptome de discomfort, tulburări vizuale, și instabilitatea filmului lacrimal cu potențială deteriorare la suprafața oculară. Este însoțită de osmolaritatea crescută a filmului lacrimal și inflamația suprafeței oculare”. Lemp, „The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop”, Ocular Surface, 5(2), 75-92 aprilie 2007. În unele realizări, tulburarea ochiului uscat este selectată dintre ochiul uscat deficient la lacrimi apoase (ADDE) sau tulburarea evaporativă a ochiului uscat, sau combinații adecvate ale acestora. În unele realizări, tulburarea ochiului uscat este sindromul Sjogren al ochiului uscat (SSDE). În unele realizări, tulburarea ochiului uscat este sindromul non-Sjogren al ochiului uscat (NSSDE).

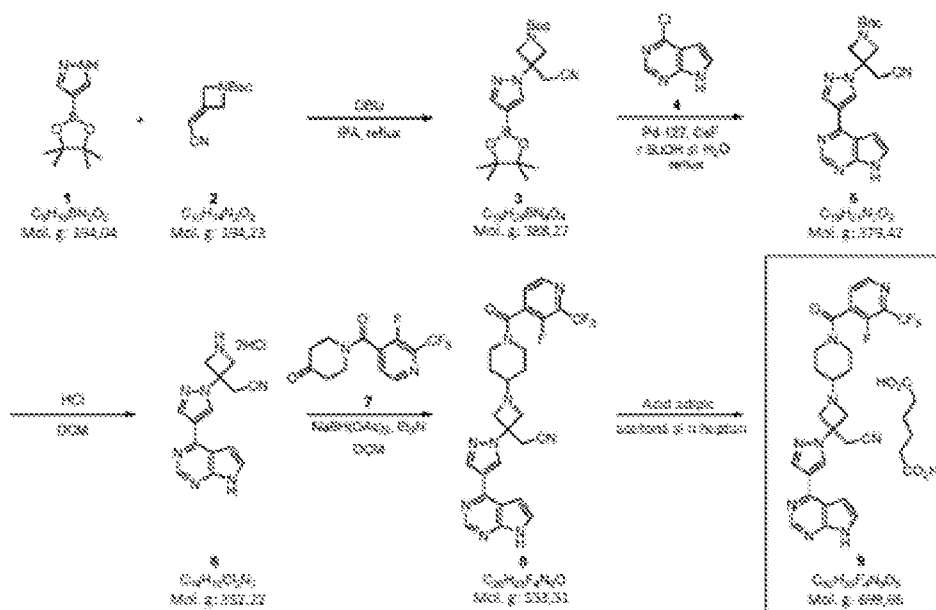
Alte boli asociate cu JAK includ conjunctivită, uveită (incluzând uveita cronică), coriodită, retinită, ciclită, sclerită, episclerită, sau irită. Alte boli asociate cu JAK includ disfuncția respiratorie sau insuficiența asociate cu infecția virală, cum ar fi gripa și SARS.

#### EXEMPLE

Invenția va fi descrisă în mai multe detalii pe calea exemplelor specifice. Următoarele exemple sunt oferite în scopuri ilustrative, și nu sunt intenționate să limiteze invenția în nici o manieră. Cei calificați în domeniu vor recunoaște cu ușurință o varietate de parametri necritici care pot fi modificați sau schimbați pentru a da în mod esențial aceleași rezultate.

**Exemplul 1. Sinteză de adipat de 2-(3-(4-(7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidină-3-il)acetoneitril (9)**

#### Schema I



3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (3). La un flacon de 1 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, și un agitator mecanic s-au adăugat secvențial izopropanol (IPA, 200 mL), 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-enă (DBU, 9,8 g, 64,4 mmol, 0,125 echiv), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1, 101 g, 520,51 mmol, 1,01 echiv) și 3-(cianometilen)azetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (2, 100 g, 514,85

mmol) la temperatura ambiantă pentru a genera un amestec de reacție ca suspensie. Amestecul de reacție rezultat a fost încălzit la reflux 30 minute pentru a furniza o soluție omogenă și amestecul a fost menținut la reflux timp de încă 2-3 ore suplimentare. După ce reacția a fost completă cum s-a monitorizat prin HPLC, s-a adăugat gradual *n*-heptan (400 mL) la amestecul de reacție timp de 45 minute în timp ce s-a menținut amestecul la reflux. Solidele au fost precipitate în timpul adăugării de *n*-heptan. O dată ce adăugarea de *n*-heptan a fost completă, amestecul a fost răcit gradual la temperatura ambiantă și agitat la temperatura ambiantă timp de încă 1 oră suplimentară. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu *n*-heptan (200 mL), și uscate sub vid la 50°C cu azot șters la greutate constantă pentru a da 3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidin-1-carboxilat de *terț*-butil (**3**, 181 g, 199,9 g teoretic, 90,5%) ca solid alb până la galben pal. Pentru **3**: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,31 (s, 1H), 7,74 (s, 1H), 4,45 - 4,23 (m, 2H), 4,23 - 4,03 (m, 2H), 3,56 (s, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,25 (s, 12H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 155,34, 145,50, 135,88, 116,88, 107,08 (br), 83,15, 79,36, 58,74 (br), 56,28, 27,96, 26,59, 24,63 ppm; C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (MW 388,27), LCMS (EI) *m/e* 389 (M<sup>+</sup> + H).

**3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)-azetidin-1-carboxilat de *terț*-butil (**5**)**. La un flacon de 1 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, și un agitator mecanic s-au adăugat 4-cloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidină (**4**, 39,6 g, 257,6 mmol), 3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidin-1-carboxilat de *terț*-butil (**3**, 100 g, 257,6 mmol, 1,0 echiv), fluorură de cesiu (136,9 g, 901,4 mmol, 3,5 echiv), *terț*-butanol (250 mL), apă (250 mL), și [1,1'-bis(di-ciclohexilfosfino)ferocen]dicloropaladiu(II) (Pd-127, 351,4 mg, 0,46 mmol, 0,0018 echiv) la temperatura ambiantă. Amestecul de reacție rezultat a fost degazat și reumplut cu azot de 3 ori, înainte de a fi încălzit la reflux și menținut la reflux sub azot timp de 20-24 ore. Când HPLC a arătat că reacția a fost completă, amestecul de reacție a fost răcit la 45-55°C în 30 minute, cele două faze au fost separate, și faza apoasă a fost eliminată. La faza organică s-a adăugat *n*-heptan (125 mL) în 30 minute la 45-55°C. Amestecul rezultat a fost răcit încet la temperatura ambiantă într-o oră și agitat la temperatura ambiantă timp de încă 2 ore suplimentare. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu *n*-heptan (100 mL), și uscate sub vid la 50°C cu azot șters la greutate constantă pentru a da 3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)-azetidin-1-carboxilat de *terț*-butil (**5**, 96,8 g, 97,7 g teoretic, 99%) ca solid galben pal. Pentru **5**: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,89 (s, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,60 (*d*, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,06 (*d*, *J* = 3,6 Hz, 1H), 4,62 - 4,41 (m, 2H), 4,31 - 4,12 (m, 2H), 3,67 (s, 2H), 1,39 (s, 9H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 155,40, 152,60, 150,63, 149,15, 139,76, 129,53, 127,65, 122,25, 116,92, 113,21, 99,71, 79,45, 58,34 (br), 56,80, 27,99, 26,83 ppm; C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> (MW 379,4), LCMS (EI) *m/e* 380 (M<sup>+</sup> + H).

**Sare diclorhidrat de 2-(3-(4-(7*H*-Pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il) azetidin-3-il)acetonitril (**6**)**. La un flacon de 0,5 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, o pâlnie suplimentară, și un agitator mecanic s-au adăugat 3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)azetidin-1-carboxilat de *terț*-butil (**5**, 15 g, 39,5 mmol), apă (7,5 mL, 416 mmol) și diclorometan (75 mL) la temperatura camerei. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei pentru a genera o suspensie. La suspensie s-a adăugat o soluție 5 M de acid clorhidric (HCl) în izopropanol (55 mL, 275 mmol, 7,0 echiv) în 5 minute. Amestecul de reacție rezultat a fost apoi încălzit la reflux ușor și menținut la reflux timp de 3-4 ore. După ce reacția a fost completă după cum s-a monitorizat prin HPLC, s-a adăugat *terț*-butil metil eter (TBME, 45 mL) la suspensia de reacție. Amestecul a fost răcit gradual la temperatura camerei, și agitat timp de o oră suplimentară. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu *terț*-butil metil eter (TBME, 45 mL) și uscate sub vid la 50°C cu azot șters la greutate constantă pentru a da sarea diclorhidrat de 2-(3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidin-3-il)acetonitril (**6**, 13,6 g, 13,9 g teoretic, 98%) ca un solid albicios până la galben deschis. Pentru **6**: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8,96 (s, 1H), 8,81 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,78 (*d*, *J* = 3,8 Hz, 1H), 7,09 (*d*, *J* = 3,7 Hz, 1H), 4,93 (*d*, *J* = 12,8 Hz, 2H), 4,74 (*d*, *J* = 12,5 Hz, 2H), 3,74 (s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 151,35, 143,75, 143,33, 141,33, 132,03, 131,97, 115,90, 114,54, 113,85, 103,18, 59,72, 54,45 (2C), 27,02 ppm; C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub> (C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>7</sub> pentru bază liberă, MW 279,30), LCMS (EI) *m/e* 280 (M<sup>+</sup> + H).

**2-(3-(4-(7*H*-Pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetonitril (**8**, bază liberă)**. La un flacon de 0,5 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, o pâlnie suplimentară, și un agitator mecanic s-au adăugat sare diclorhidrat de 2-(3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidin-3-il)acetonitril (**6**, 20 g, 56,78 mmol), diclorometan (200 mL) și trietilamină (TEA, 16,62 mL, 119,2 mmol, 2,1 echiv) la temperatura ambiantă. Amestecul a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 30 minute înainte ca 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)-izonicotinoil)piperidin-4-ona (**7**, 17,15 g, 57,91 mmol, 1,02 echiv) să fie adăugată la amestec. Amestecul a fost apoi tratat cu triacetoxiborohidru de sodiu (25,34 g, 113,6 mmol, 2,0 echiv) timp de 5 minute la temperatura ambiantă (sub 26°C). Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 2 ore. După ce reacția a fost completă după

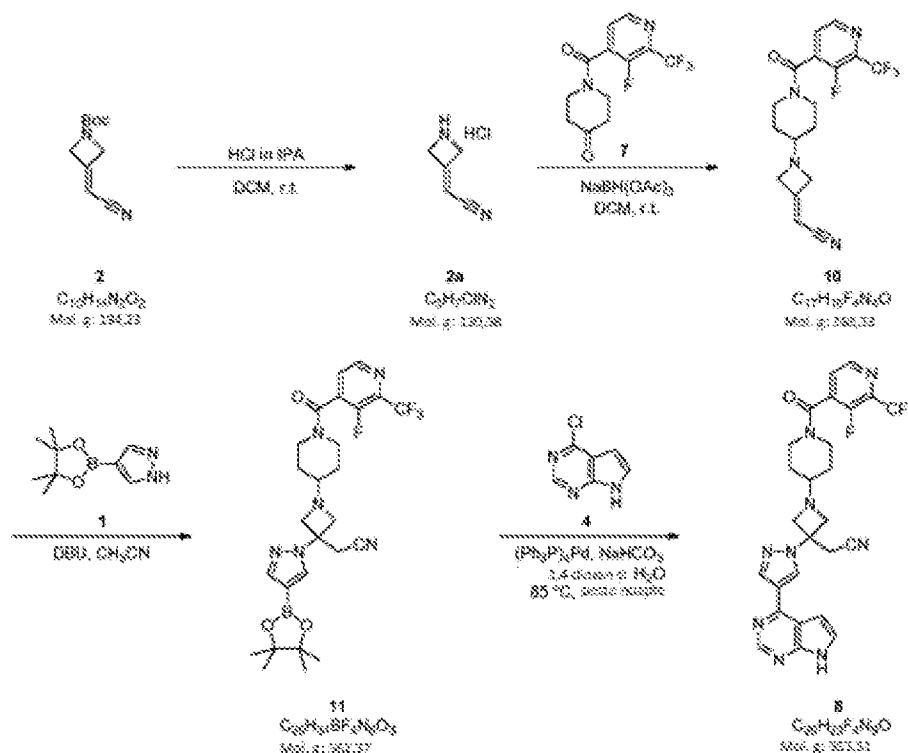
cum s-a monitorizat prin HPLC, amestecul de reacție a fost stins cu soluție apoasă saturată de NaHCO<sub>3</sub> (200 mL). Cele două faze au fost separate și faza apoasă a fost extrasă cu clorură de metilen (200 mL). Faza organică combinată a fost spălată cu 4% saramură (100 mL) urmată de schimbarea cu solvent a clorurii de metilen la acetonă prin distilare. Soluția rezultată a produsului brut dorit (8) în

5 acetona a fost utilizată direct pentru formarea ulterioară a sării adipat. O mică porțiune de soluție a fost purificată prin cromatografie pe coloană (SiO<sub>2</sub>, 0 - 10% de MeOH în eluare cu gradient EtOAc) pentru a da  
 2-(3-(4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetoneitril (8 bază liberă) analitic pur ca un solid  
 10 alburii. Pentru 8: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,17 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,70 (m, 2H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 3,6, 2,3 Hz, 1H), 7,09 (dd, *J* = 3,6, 1,7 Hz, 1H), 4,10 (m, 1H), 3,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 3,61 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,46 (m, 1H), 3,28 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H), 3,09 (ddd, *J* = 13,2, 9,5, 3,1 Hz, 1H), 2,58 (m, 1H), 1,83 - 1,75 (m, 1H), 1,70 - 1,63 (m, 1H), 1,35 - 1,21 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160,28, (153,51, 150,86), 152,20, 150,94, 149,62, (146,30, 146,25), 139,48, (134,78, 134,61), (135,04, 134,92, 134,72, 134,60, 134,38, 134,26, 134,03, 133,92), 129,22, 127,62, 126,84, 121,99, 122,04, (124,77, 122,02, 119,19, 116,52), 117,39, 113,00, 99,99, 61,47, 60,49, 57,05, 44,23, 28,62, 27,88, 27,19 ppm; C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O (MW, 553,51), LCMS (EI) *m/e* 554,1 (M<sup>+</sup> + H).

**Adipat de 2-(3-(4-(7H-Pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetoneitril (9).** La un flacon de 0,5 L echipat  
 20 cu un agitator mecanic, un termocuplu, o pâlnie de adăugare, și o admisie de azot s-a adăugat o soluție de  
 2-(3-(4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetoneitril brut (8 bază liberă, 31,38 g, 56,7  
 mmol) în acetonă (220 mL) și acid adipic (8,7 g, 59,53 mmol, 1,05 echiv) la temperatura ambiantă. Amestecul de reacție a fost apoi încălzit la reflux pentru a da o soluție. S-a adăugat gradual *n*-heptan  
 25 (220 mL) la amestecul de reacție la 40-50°C într-o oră. Amestecul rezultat a fost răcit gradual la temperatura ambiantă într-o oră și agitat la temperatura ambiantă timp de încă 16 ore suplimentare. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu *n*-heptan (2 X 60 mL), și uscate sub vid la 50°C cu azot șters la greutate constantă pentru a da adipat de 2-(3-(4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetoneitril (9, 34,0  
 30 g, 39,7 g teoretic, 85,6% pentru două etape) ca solid alb până la alburii. 9: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,16 (s, 1H), 12,05 (brs, 2H), 8,85 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,69 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,93 (t, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 3,6, 2,3 Hz, 1H), 7,09 (dd, *J* = 3,6, 1,7 Hz, 1H), δ 4,11 (dt, *J* = 11,0, 4,4 Hz, 1H), 3,77 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,60 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,58 (s, 2H), 3,44 (dt, *J* = 14,4, 4,6 Hz, 1H), 3,28 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,09 (ddd, *J* = 13,2, 9,6, 3,2 Hz, 1H), 2,58 (tt, *J* = 8,6, 3,5 Hz, 1H), 2,28 - 2,17 (m, 4H), 1,83 - 1,74 (m, 1H), 1,67 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 1,59 - 1,46 (m, 4H), 1,37 - 1,21 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 174,38, 160,29, (153,52, 150,87), 152,20, 150,94, 149,63, (146,30, 146,25), 139,48, (134,79, 134,62), (135,08, 134,97, 134,74, 134,62, 134,38, 134,28, 134,04, 133,93), 129,21, 127,62, 126,84, 122,05, (124,75, 122,02, 119,29, 116,54), 117,39, 113,01, 99,99, 61,47, 60,50, 57,06, 44,24, 33,42, 30,70, 28,63, 27,89, 27,20, 24,07 ppm; C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub> (MW 699,66; C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>F<sub>4</sub>N<sub>9</sub>O pentru bază liberă, MW, 553,51), LCMS (EI) *m/e* 554,0 (M<sup>+</sup> + H).

**Exemplul 2: Sinteză alternativă de 2-(3-(4-(7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-il)acetoneitril**

## Schema II



**Clorhidrat de 2-(azetidin-3-iliden)acetonitril (2a).** La un flacon de 0,5 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, și un agitator mecanic s-au adăugat 3-(cianometilen)azetidin-1-carboxilat de *terf*-butil (**2**, 30 g, 154,46 mmol) și metilenclorură (300 mL) la temperatura ambiantă. Soluția a fost apoi tratată cu o soluție 5 M de acid clorhidric (HCl) în soluție de izopropanol (294,2 mL, 1,54 mol, 10 echiv) la temperatura ambiantă și amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 18 ore. După ce reacția a fost completă cum s-a monitorizat prin HPLC, la suspensie s-a adăugat *terf*-butil metil eter (TBME, 150 mL), și amestecul a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 2 ore. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu *n*-heptan (2 X 100 mL), și uscate pe pânză de filtrare la temperatura ambiantă timp de 3 ore pentru a da clorhidratul de 2-(azetidin-3-iliden)acetonitril (**2a**, 13,7 g, 20,2 g teoretic, 67,8 %) ca solid alb. Pentru **2a**:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,99 (s, 2H), 5,94 (p,  $J=2,5$  Hz, 1H), 4,85 - 4,80 (m, 2H), 4,77 - 4,71 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,65, 114,54, 94,78, 55,26, 54,63 ppm;  $\text{C}_5\text{H}_7\text{ClN}_2$  (MW 130,58;  $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2$  pentru bază liberă, MW 94,11), LCMS (EI) *m/e* 95 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

**2-(1-(1-(3-Fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-iliden)acetonitril (10).** La un flacon de 0,25 L echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, și un agitator magnetic s-au adăugat clorhidrat de 2-(azetidin-3-iliden)acetonitril (**2a**, 4,5 g, 34,46 mmol), 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil) piperidin-4-onă (**7**, 10 g, 34,46 mmol, 1,0 echiv), și metilenclorură (100 mL) la temperatura ambiantă și amestecul rezultat a fost apoi tratat cu triacetoxiborohidruură de sodiu (14,6 g, 68,93 mmol, 2,0 echiv) la temperatura ambiantă. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 2 ore înainte de a fi stins cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu ( $\text{NaHCO}_3$ ) (50 mL). Cele două faze au fost separate și faza apoasă a fost extrasă cu diclorometan (200 mL). Faza organică combinată a fost spălată cu apă (50 mL) și saramură (50 mL) și concentrată sub presiune redusă pentru a da produsul brut dorit (**10**), care a fost purificat prin cromatografie pe coloană ( $\text{SiO}_2$ , 0 - 10 % acetat de etil în eluare cu gradient hexan) pentru a da 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetidin-3-iliden)acetonitril (**10**, 9,5 g, 12,7 g teoretic, 74,8 %) ca solid alb. Pentru **10**:  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,57 (d,  $J=4,7$  Hz, 1H), 7,54 (t,  $J=4,6$  Hz, 1H), 5,29 (p,  $J=2,4$  Hz, 1H), 4,18 - 4,08 (m, 1H), 4,08 - 4,03 (m, 2H), 3,98 - 3,94 (m, 2H), 3,57 - 3,39 (m, 2H), 3,17 - 3,04 (m, 1H), 2,56 (tt,  $J=7,4, 3,5$  Hz, 1H), 1,86 - 1,77 (m, 1H), 1,75 - 1,64 (m, 1H), 1,54 - 1,43 (m, 1H), 1,43 - 1,31 (m, 1H) ppm;  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161,34, 160,73, 152,62 (d,  $J=269,1$  Hz), 145,75 (d,  $J=6,1$  Hz), 136,73 (qd,  $J=36,1, 12,0$  Hz), 134,56 (d,  $J=16,9$  Hz), 126,89, 120,58 (qd,  $J=275,0, 4,9$  Hz), 115,11, 92,04, 62,05, 60,57 (2C), 44,47, 39,42, 29,38, 28,47 ppm;  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}$  (MW 368,33), LCMS (EI) *m/e* 369 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

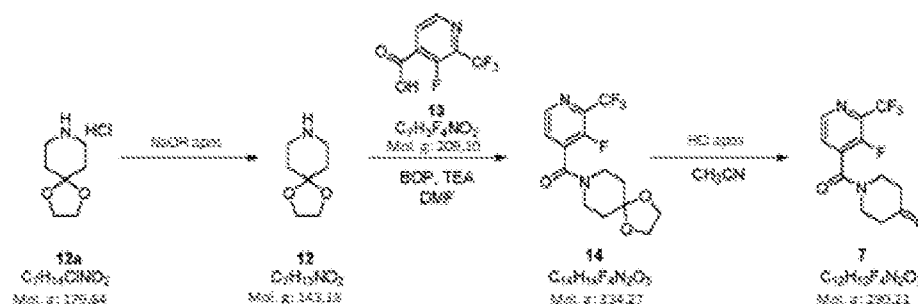
**2-(1-(1-(3-Fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidin-3-il)acetonitril (11).** La un flacon de 25 mL echipat

cu o admisie de azot, un termocuplu, și un agitator magnetic s-au adăugat 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (1, 210 mg, 1,08 mmol, 1,08 echiv), 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetid-3-iliden)acetonitril (10, 370 mg, 1,0 mmol) și acetonitril (3 mL) la temperatura ambiantă. Soluția a fost apoi tratată cu 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undecenă (DBU, 173 mg, 0,17 mL, 1,12 mmol, 1,12 echiv) la temperatura ambiantă și amestecul de reacție rezultat a fost încălzit la 50°C și agitat la 50°C peste noapte. Când reacția a fost completă cum s-a monitorizat prin HPLC, amestecul de reacție a fost încălzit direct pe o coloană de gel de siliciu (SiO<sub>2</sub>) pentru purificare cromatografică (0 - 2,5 % MeOH în eluare cu gradient de acetat de etil) pentru a da 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetid-3-il)acetonitril (**11**, 263 mg, 562,4 mg teoretic, 46,7 %) ca solid alb. Pentru **11**: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,64 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 8,22 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H), 7,88 (dd, *J* = 4,7 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H), 4,10 - 3,99 (m, 1H), 3,58 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,52 - 3,42 (m, 2H), 3,44 (s, 2H), 3,41 - 3,33 (m, 1H), 3,28 - 3,15 (m, 1H), 3,03 (ddd, *J* = 12,9, 9,2, 3,2 Hz, 1H), 2,51 - 2,44 (m, 1H), 1,77 - 1,66 (m, 1H), 1,64 - 1,54 (m, 1H), 1,28 - 1,17 (m, 2H), 1,24 (s, 12H) ppm; <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160,22, 152,13 (d, *J* = 265,8 Hz), 146,23 (d, *J* = 5,7 Hz), 145,12, 135,41, 134,66 (d, *J* = 16,9 Hz), 134,43 (qd, *J* = 35,0, 11,7 Hz), 127,58, 120,61 (qd, *J* = 274,4, 4,6 Hz), 117,35, 106,59 (br), 83,10, 61,40, 60,53 (2C), 56,49, 44,17, 38,99, 28,55, 27,82, 27,02, 24,63 ppm; C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> (MW 562,37), LCMS (EI) *m/e* 563 (M<sup>+</sup> + H).

**2-(3-(4-(7*H*-Pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetid-3-il)acetonitril (**8**).** La un flacon de 25 mL echipat cu o admisie de azot, un termocuplu, o pâlnie suplimentară, și un agitator magnetic s-au adăugat 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetid-3-il)acetonitril (**11**, 307 mg, 0,546 mmol), 4-cloro-7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidină (**4**, 84,8 mg, 0,548 mmol, 1,0 echiv), bicarbonat de sodiu (NaHCO<sub>3</sub>, 229 mg, 2,72 mmol, 5,0 echiv), apă (1,6 mL), și 1,4-dioxan (1,6 mL) la temperatura ambiantă. Amestecul a fost apoi tratat cu tetrakis(trifenilfosfin)paladiu(0) (12,8 mg, 0,011 mmol, 0,02 echiv) la temperatura ambiantă și amestecul de reacție rezultat a fost degazat și reumplut cu azot de 3 ori, înainte de a fi încălzit la 85°C. Amestecul de reacție a fost agitat la 85°C sub azot peste noapte. Când reacția a fost completă cum s-a monitorizat prin HPLC, amestecul de reacție a fost concentrat la sec sub presiune redusă și produsul dorit, 2-(3-(4-(7*H*-pirolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-il)azetid-3-il)acetonitril (**8** bază liberă, 135 mg, 302,2 mg teoretic, 44,6 %), a fost obținut ca solid alburiu prin purificarea directă prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu (SiO<sub>2</sub>) (0 - 10% eluare cu gradient de acetat de etil în hexan) a amestecului de reacție uscat. Compusul obținut prin această abordare sintetică este identic în fiecare aspect comparabil cu compusul **8** fabricat prin metoda sintetică cum s-a descris mai sus în Exemplul 1.

### Exemplul 3. Sinteză de 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7)

#### Schema III



**(3-Fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il) metanonă (14).** La un reactor de 30 L echipat cu un agitator mecanic, o pâlnie de adăugare și un sept s-au încărcat hidroxid de sodiu (NaOH, 1,4 kg, 35 mol, 2,0 echiv) și apă (7 L) și soluția rezultată a fost tratată cu clorhidrat de 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan (3,13 kg, 17,43 mol) la temperatura ambiantă. Amestecul rezultat a fost apoi agitat la temperatura ambiantă timp de 30 minute, înainte de a fi saturat cu clorură de sodiu solidă (1,3 kg) și extras cu 2-metiltetrahidrofuran (3 × 7 L). Faza organică combinată a fost uscată cu sulfat de sodiu anhidru (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,3 kg) și concentrată sub presiune redusă (70 mmHg) la 50°C după îndepărtarea reactivului de uscare, sulfat de sodiu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), prin filtrare. Uleiul galben astfel obținut a fost distilat sub presiune redusă (80 mmHg, de la 115 până la 120°C) pentru a da 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan (2,34 kg, 2,496 kg teoretic, 93,8%) ca ulei clar, care a fost utilizat direct în reacția de cuplare ulterioară. La un reactor uscat de 100 L echipat cu un agitator mecanic, o pâlnie de adăugare, un termometru și o evacuare cu vid s-a încărcat acid 3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinic (**13**, 3,0 kg,

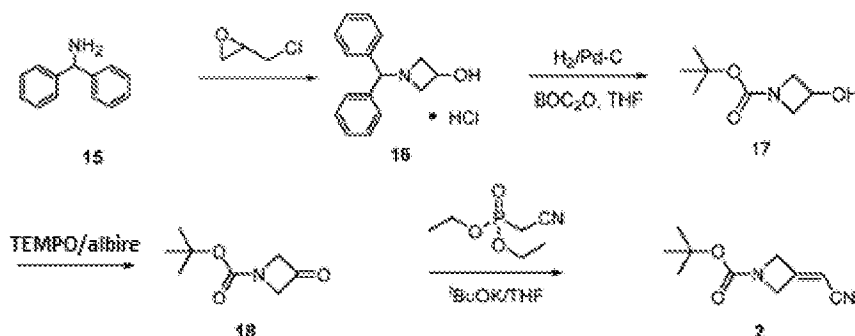
14,35 mol), hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfoniu (reactiv BOP, 7,6 kg, 17,2 mol, 1,2 echiv), 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan (2,34 kg, 16,36 mol, 1,14 echiv) și *N,N*-dimetilformamidă (DMF, 18 L) la temperatura ambiantă. Soluția rezultată a fost apoi agitată la temperatura ambiantă timp de 20 minute înainte de a fi răcită la 5 până la 10°C. S-a adăugat apoi trietilamină (Et<sub>3</sub>N, 4 L, 28,67 mol, 2,0 echiv) la amestecul de reacție într-o oră și temperatura internă a fost ținută între 5°C și 10°C în timpul adăugării de trietilamină. Soluția maro închis astfel obținută a fost agitată timp de 12 ore la temperatura ambiantă (aproximativ 20°C) și apoi răcită la, în jur de 10°C. Cu agitare viguroasă, s-au adăugat secvențial 18 L de soluție apoasă de bicarbonat de sodiu saturat (NaHCO<sub>3</sub>) și 36 L de apă la amestecul de reacție răcit și temperatura internă a fost ținută sub 15°C. Precipitatul (turtă de filtru) astfel obținut a fost colectat prin filtrare. Faza apoasă a fost apoi saturată cu 12 kg de clorură de sodiu solidă (NaCl) și extrasă cu EtOAc (2 × 18 L). Stratul organic combinat a fost spălat cu soluție apoasă de bicarbonat de sodiu saturat (NaHCO<sub>3</sub>) (18 L), și apă (2 × 18 L) în secvență. Turta de filtru colectată a fost apoi dizolvată înapoi în faza organică și soluția maro închis rezultată a fost spălată cu apă (2 × 18 L) înainte de a fi concentrată sub presiune redusă (40 - 50 °C, 30 mm Hg) pentru a da aproximativ 5,0 kg din produsul brut dorit (**14**) ca ulei maro vâscos. Produsul brut obținut mai sus a fost apoi dizolvat în EtOH (8,15 L) la 50°C și soluția rezultată a fost tratată cu apă (16,3 L) în 30 minute la, în jur de 50°C. Soluția maro a fost însământată înainte de a fi răcită gradual la temperatura ambiantă (aproximativ 20°C) timp de 3 ore cu agitare și agitată la temperatura ambiantă timp de 12 ore. Solidele au fost colectate prin filtrare, spălate cu un amestec de EtOH și apă (EtOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 20, 2 L) și uscate sub presiune redusă (50 mmHg) la aproximativ 60°C timp de 24 ore pentru a da (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanonă (**14**, 3,98 kg, 4,797 kg teoretic, 83,0%) ca solid alb. Pentru **14**: <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,68 Hz, 1H, NCH în piridină), 7,92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,68 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4,68 Hz, 1H, NCCH în piridină), 3,87 - 3,91 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3,70 (br s, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, unul din alt NCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, ambele în poziție axială), 3,26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,86 Hz, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, unul din alt NCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, ambele în poziție ecuatorială), 1,67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,86 Hz, 2H, unul din NCCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, unul din alt NCCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, ambele în poziție ecuatorială), 1,58 (br s, 2H, unul din NCCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, unul din alt NCCH<sub>2</sub> în inel de piperidină, ambele în poziție axială) ppm; <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161,03 (N-C=O), 151,16 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266,03 Hz, C-F), 146,85 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 4,32 Hz, NCH în piridină), 135,24 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 11,51 Hz, C-C=O), 135,02 (cvartet, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 34,57 Hz, NCCF<sub>3</sub>), 128,24 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 7,48 Hz, NCCH în piridină), 119,43 (d × cvartet, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274,38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4,89 Hz, CF<sub>3</sub>), 106,74 (OCO), 64,60 (OCCO), 45,34 (NC în inel de piperidină), 39,62 (NC în inel de piperidină), 34,79 (NCC în inel de piperidină), 34,10 (NCC în inel de piperidină) ppm; <sup>19</sup>F RMN (282 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -64,69 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, F<sub>3</sub>C), -129,26 (d × cvartet, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 3,96 Hz, FC) ppm; C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (MW, 334,27), LCMS (EI) *m/e* 335,1 (M<sup>+</sup> + H).

**1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7)**. Într-un balon de 5 L cu 4 găhuri cu fund rotund echipat cu un agitator mecanic, un termocuplu, o pâlnie de adăugare și o admisie de azot s-au încărcat (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanonă (**14**, 100 g, 0,299 mol) în acetonitril (ACN, 400 mL) la temperatura ambiantă. Soluția rezultantă a fost răcită sub 10°C înainte de a fi tratată cu 6,0 N soluție apoasă de acid clorhidric (HCl) (450 mL, 2,70 mol, 9,0 echiv) în timp ce temperatura internă a fost ținută sub 10°C. Amestecul de reacție rezultat a fost apoi încălzit gradual la temperatura camerei și o cantitate suplimentară de 6,0 N soluție apoasă de acid clorhidric (HCl) (1050 mL, 6,30 mol, 21,0 echiv) a fost introdusă încet în amestecul de reacție la temperatura ambiantă timp de 8 ore prin pâlnie de adăugare. Când reacția a fost completă cum s-a monitorizat prin HPLC, amestecul de reacție a fost apoi răcit la 0°C înainte de a fi tratat cu 30% hidroxid de sodiu apos (NaOH, 860 mL, 8,57 mmol, 28,6 echiv) în timp ce temperatura internă a fost ținută sub 10°C. Amestecul de reacție rezultat a fost ulterior încălzit la temperatura ambiantă înainte de adăugarea de bicarbonat de sodiu solid (NaHCO<sub>3</sub>, 85,0 g, 1,01 mol, 3,37 echiv) într-o oră. Amestecul a fost apoi extras cu EtOAc (2 × 1,2 L), și faza organică combinată a fost spălată cu 16% soluție apoasă de clorură de sodiu (2 × 800 mL) și concentrată până la aproximativ 1,0 L prin distilare în vid. S-a adăugat *n*-heptan (2,1 L) la reziduu, și amestecul rezultat a fost concentrat până la 1,0 L prin distilare în vid. La amestecul concentrat s-a adăugat *n*-heptan (2,1 L). Suspensia albă rezultată a fost apoi concentrată până la 1,0 L prin distilare în vid. La suspensia albă s-a adăugat apoi metil *terf*-butil eter (MTBE, 1,94 L). Soluția tulbure albă a fost încălzită la 40°C pentru a obține o soluție clară. Soluția rezultată a fost concentrată până la aproximativ 1,0 L prin distilare în vid. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. Precipitatul alb a fost colectat prin filtrare, spălat cu *n*-heptan (400 mL) și uscat pe filtru sub azot cu tragerea vidului pentru a da 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (**7**, 78,3 g, 86,8 g conducând teoretic la randamentul de 90,2%, și puritate de 98% după cum s-a măsurat prin HPLC) ca un solid alburii. Pentru **7**: <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69 Hz, 1H, NCH în piridină), 7,97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> =

4,69 Hz, 1H, NCCH în piridină), 3,92 (br s, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din alt NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în poziție axială), 3,54 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din alt NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în poziție ecuatorială), 2,48 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,44 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>), 2,34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>) ppm; <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266,89 Hz, C-F), 146,90 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 6,05 Hz, NCH în piridină), 135,56 (C-C=O), 134,78 -135,56 (m, NCCF<sub>3</sub>), 128,27 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 7,19 Hz, NCCH în piridină), 119,52 (d × cvartet, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274,38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4,89 Hz, CF<sub>3</sub>), 45,10 (NC în inelul de piperidină) ppm, un carbon (NCC în inelul de piperidină) lipsind din cauza suprapunerii cu (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; <sup>19</sup>F RMN (282 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -64,58 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, F<sub>3</sub>C), -128,90 (d × cvartet, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4,05 Hz, FC) ppm; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 290,21), LCMS (EI) *m/e* 291,1 (M<sup>+</sup> + H).

#### Exemplul 4. Sinteză de 3-(cianometilen)azetidină-1-carboxilat de *terț*-butil

Schema IV



15 **Clorhidrat de 1-benzhidrilazetidină-3-ol (16).** O soluție de difenilmetanamină (2737 g, 15,0 mol, 1,04 echiv) în metanol (MeOH, 6 L) a fost tratată cu 2-(clorometil)oxiran (1330 g, 14,5 mol) dintr-o pâlnie de adăugare la temperatura ambiantă. În timpul adăugării inițiale, a fost observată o ușoară endotermă. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura camerei timp de 3 zile, înainte de a fi încălzit la reflux timp de încă 3 zile suplimentare. Când TLC a arătat că reacția a fost considerată completă, amestecul de reacție a fost mai întâi răcit la temperatura camerei și apoi până la 0-5°C într-o baie de gheață. Solidele au fost colectate prin filtrare și spălate cu acetonă (4 L) pentru a da primul recoltă a produsului brut dorit (1516 g). Filtratul a fost concentrat sub presiune redusă și semisolidul rezultat a fost diluat cu acetonă (1 L). Acest solid a fost apoi colectat prin filtrare pentru a da a doua recoltă a produsului brut dorit (221 g). Produsul brut, clorhidrat de 1-benzhidrilazetidină-3-ol (1737 g, 3998,7 g teoretic, randament 43,4%), a fost găsit ca fiind suficient de pure pentru a fi utilizate în reacția ulterioară fără purificare suplimentară. <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,28 (br. d, 1H), 7,7 (m, 5H), 7,49 (m, 5H), 6,38 (d, 1H), 4,72 (br. s, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,12 (m, 2H), 3,85 (m, 2H) ppm; C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClNO (MW 275,77; C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO pentru bază liberă, MW, 239,31), LCMS (EI) *m/e* 240 (M<sup>+</sup> + H). **3-Hidroxiiazetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (17).** O suspensie de clorhidrat de 1-benzhidrilazetidină-3-ol (625 g, 2,27 mol) în 10% soluție de carbonat de sodiu apos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 L) și diclorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5 L) a fost agitată la temperatura camerei până când toate solidele s-au dizolvat. Cele două straturi au fost separate, și stratul apos a fost extras cu diclorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 L). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) și concentrate sub presiune redusă. Baza liberă 1-benzhidrilazetidină-3-ol brută rezultată a fost apoi dizolvată în THF (6 L) și soluția a fost plasată într-un reactor Parr mare. S-au adăugat dicarbonat de di-*terț*-butil (BOC<sub>2</sub>O, 545 g, 2,5 mol, 1,1 echiv) și 20 % paladiu (Pd) pe carbon (125 g, 50% umed) la reactorul Parr. Vasul a fost încărcat la 30 psi cu gaz de hidrogen (H<sub>2</sub>) și agitat sub atmosferă stabilă de hidrogen (vasul a fost reîncărcat de trei ori pentru a menține presiunea la 30 psi) la temperatura camerei timp de 18 ore. Când HPLC a arătat că reacția a fost completă (nu s-a mai preluat hidrogen), amestecul de reacție a fost filtrat printr-un strat de celite și stratul de celite a fost spălat cu THF (4 L). Filtratele au fost concentrate sub presiune redusă pentru a îndepărta solventul și reziduu a fost încărcat pe o coloană Biotage 150 cu o cantitate minimă de diclorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Coloana a fost eluată cu 20-50% acetat de etil în *n*-heptan și fracțiunile conținând produsul pur dorit, 3-hidroxiiazetidină-1-carboxilat de *terț*-butil, au fost colectate și combinate. Solvenții au fost îndepărtați sub presiune redusă pentru a da 3-hidroxiiazetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (357 g, 393,2 g teoretic, randament 90,8%) ca ulei incolor, care s-a solidificat după ce a stat la temperatura ambiantă în vid. <sup>1</sup>HNMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,56 (m 1H), 4,13 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 1,43 (s, 9H) ppm.

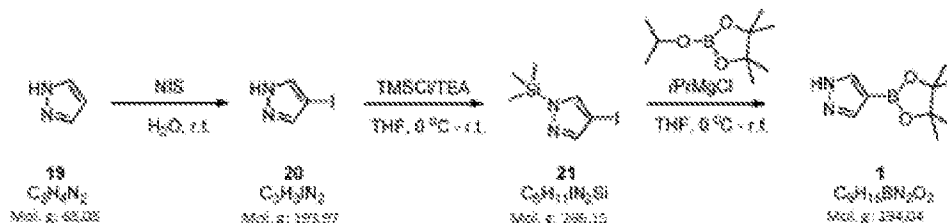
**3-oxoiazetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (18).** O soluție de 3-hidroxiiazetidină-1-carboxilat de *terț*-butil (50 g, 289 mmol) în acetat de etil (400 mL) a fost răcită la 0°C. Soluția rezultată a fost apoi

tratăată cu TEMPO solid (0,5 g, 3,2 mmol, 0,011 echiv) și o soluție de bromură de potasiu (KBr, 3,9 g, 33,2 mmol, 0,115 echiv) în apă (60 mL) la 0-5°C. În timp ce se menține temperatura reacției între 0-5°C, se adaugă o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (NaHCO<sub>3</sub>, 450 mL) și o soluție apoasă de hipoclorit de sodiu (NaClO, 10-13% clor disponibil, 450 mL). Odată ce s-a adăugat soluția de hipoclorit de sodiu, culoarea amestecului de reacție s-a modificat imediat. Când s-a adăugat cantitatea suplimentară de soluție de hipoclorit de sodiu, culoarea amestecului de reacție s-a decolorat gradual. Când TLC a arătat că toată materia primă a fost consumată, culoarea a amestecului de reacție nu s-a mai modificat. Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu acetat de etil (EtOAc, 500 mL) și două straturi au fost separate. Stratul organic a fost spălat cu apă (500 mL) și soluție apoasă saturată de clorură de sodiu (500 mL) și uscat pe sulfat de sodiu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Solventul a fost apoi îndepărtat sub presiune redusă pentru a da produsul brut, 3-oxoazetidină-1-carboxilat de *tert*-butil (48 g, 49,47 g teoretic, randament 97%), care a fost găsit ca fiind suficient de pur și a fost utilizat direct în reacția ulterioară fără purificare suplimentară. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 4,65 (s, 4H), 1,42 (s, 9H) ppm.

**3-(Cianometilen)azetidină-1-carboxilat de *tert*-butil (2).** S-au adăugat dietil cianometil fosfat (745 g, 4,20 mol, 1,20 echiv) și tetrahidrofuran anhidru (THF, 9 L) la un flacon cu patru gâturi echipat cu o sondă termică, o pâlnie de adăugare și tubul de protecție la azot la temperatura camerei. Soluția a fost răcită cu o baie de gheață-metanol la -14°C și 1,0 M soluție de *tert*-butoxid de potasiu (*t*-BuOK) în tetrahidrofuran anhidru (THF, 3,85 L, 3,85 mol, 1,1 echiv) a fost adăugată timp de 20 min menținând temperatura reacției sub -5°C. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat timp de 3 ore la -10°C și o soluție de 1-*tert*-butoxicarbonil-3-azetidionă (600 g, 3,50 mol) în tetrahidrofuran anhidru (THF, 2 L) a fost adăugată timp de 2 ore menținând temperatura internă sub -5°C. Amestecul de reacție a fost agitat de la -5 până la -10°C timp de 1 oră și apoi încălzit încet la temperatura camerei și agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu apă (4,5 L) și soluție saturată apoasă de clorură de sodiu (NaCl, 4,5 L) și extras cu acetat de etil (EtOAc, 2 × 9 L). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (6 L) și uscate pe sulfat de sodiu anhidru (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Solventul a fost îndepărtat sub presiune redusă și reziduul a fost diluat cu diclorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4 L) înainte de a fi absorbit pe gelul de siliciu (SiO<sub>2</sub>, 1,5 Kg). Produsul brut, care a fost absorbit pe gelul de siliciu, a fost purificat prin cromatografie rapidă pe coloană (SiO<sub>2</sub>, 3,5 Kg, 0 - 25% EtOAc/eluare cu gradient de hexani) pentru a da 3-(cianometilen)azetidină-1-carboxilat de *tert*-butil (2, 414,7 g, 679,8 g teoretic, randament 61%) ca solid alb. Pentru 2: <sup>1</sup>H RMN (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,40 (m, 1H), 4,70 (m, 2H), 4,61 (m, 2H), 1,46 (s, 9H) ppm; C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 194,23), LCMS (EI) *m/e* 217 (M<sup>+</sup> + Na).

#### Exemplul 5. Sinteză de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

##### Schema V



**4-Iodopirazol (20).** Un flacon echipat cu o admisie de azot, o pâlnie de adăugare, o sondă termică, și un agitator mecanic a fost încărcat cu pirazol (1, 450 g, 6,62 mol) și tetrahidrofuran (THF, 5 L) la temperatura ambiantă. Amestecul a fost apoi răcit la 10°C și la amestec s-a adăugat *N*-iodosuccinimidă (NIS, 1490 g, 6,62 mol, 1,0 echiv) în porții ca solid la aproximativ 10°C. Amestecul de reacție rezultat a fost apoi agitat la temperatura ambiantă timp de 1 oră (timp de reacție mai lungi pot fi necesari depinzând de temperatura ambiantă). Amestecul a fost apoi filtrat și THF a fost îndepărtat sub presiune redusă. Reziduul a fost suspendat în acetat de etil (6 L) și materialul insolubil a fost filtrat. Filtratul închis a fost spălat secvențial cu soluție apoasă saturată de tiosulfat de sodiu (2 × 3 L) (stratul organic se deschide spre galben pal), apă (2 × 3 L), și saramură (2 L). Stratul organic rezultat a fost apoi uscat pe sulfat de sodiu, filtrat, și concentrat sub presiune redusă pentru a da 4-iodopirazol (1138 g, 1284,1 g teoretic, 88,6%) ca solid alb până la galben pal după ce este uscat într-un cuptor cu vid la aproximativ 30°C peste noapte. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,17 (bs, 1H), 7,93 (bs, 1H), 7,55 (bs, 1H) ppm; C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>IN<sub>2</sub> (MW, 193,97), LCMS (EI) *m/e* 195 (M<sup>+</sup> + H).

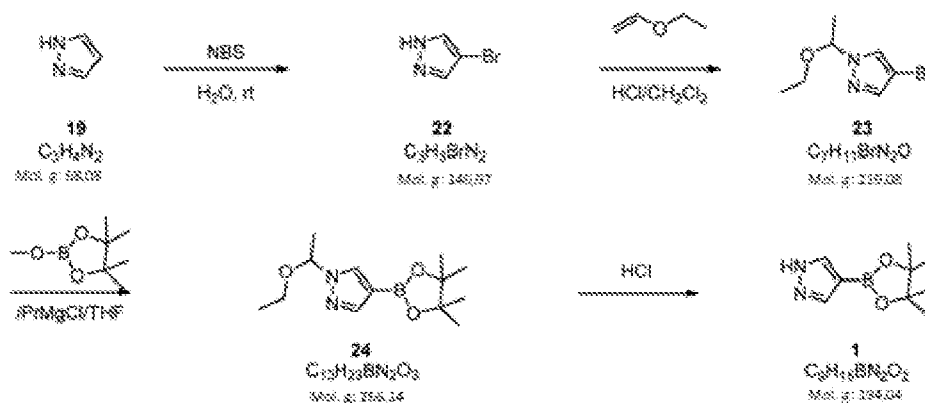
**1-Trimetilsilil-4-iodopirazol (21).** La un flacon echipat cu un condensator de reflux, o admisie de azot, un agitator mecanic, și o sondă termică a fost încărcat cu 4-iodopirazol (200 g, 1,03 mol) și THF (2 L) la temperatura ambiantă. La această soluție s-a adăugat trietilamină (TEA, 158 mL, 1,13 mol, 1,1 echiv) și soluția rezultată a fost răcită la 0°C într-o baie cu gheață-saramură. La această soluție s-a adăugat clorotrimetilsilan (TMS-Cl, 137 mL, 1,08 mol, 1,05 echiv) cu agitare viguroasă permițând ca temperatura să ajungă la 18°C. (Reacția devine foarte groasă și dificil de agitat, dar devine gestionabilă

după un timp). Când procesul exotermic s-a domolit, baia rece a fost îndepărtată și reacția a fost încălzită la temperatura camerei. Reacția a fost urmată de GC și a fost găsită ca fiind considerată completă după aproximativ 1 oră (luarea unei mostre de reacție trebuie să fie făcută fără aer și diluată cu solvent uscat pentru a preveni hidroliza TMS). Amestecul de reacție a fost apoi diluat cu *n*-heptan (2 L) înainte de a fi filtrat sub azot. Solventul a fost îndepărtat din filtrat sub presiune redusă aerisind vaporizatorul rotativ cu azot. Uleiul rezidual a fost diluat cu *n*-heptan (1 L) și reconcentrat. Dacă s-au format solide după adăugarea *n*-heptanului, a fost necesară o a doua filtrare. Reziduuul a fost apoi distilat sub presiune redusă (70 - 90°C la aproximativ 0,5 Torr) utilizând un Kugelrohr pentru a da 1-trimetilsilil-4-iodopirazol (263 g, 274,1 g teoretic, 96%) ca ulei incolor. Acest material trebuie să fie ținut sub azot la toate momentele deoarece gruparea TMS hidrolizează rapid. Ulterior, s-a găsit că 1-trimetilsilil-4-iodopirazolul poate fi preparat prin încălzirea iodopirazolului cu 2 echivalenți de hexametildisilazan timp de 1 oră.

**4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1).** Un flacon echipat cu un agitator mecanic, o admisie de azot, o pâlnie de adăugare și o sondă termică a fost încărcat cu 1-trimetilsilil-4-iodopirazol (225,1 g, 0,85 mol) și THF (2200 mL) la temperatura ambiantă. Acest amestec a fost răcit la aproximativ -6°C într-o baie cu gheață/sare/saramură înainte ca o soluție de izopropil clorură de magneziu în THF (2 M soluție în THF, 510 mL, 1,02 mol, 1,2 echiv) să fie adăugată la o rată astfel încât temperatura internă să nu depășească 0°C. Măsura schimbului de metal/halogen a fost monitorizată prin GC și a fost găsită completă după aproximativ 10 min. La soluția portocalie maro s-a adăugat apoi 2-izopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan (izopropilpinacolborat, 347 mL, 1,7 mol, 2,0 echiv) încet menținând inițial temperatura sub 0°C și apoi crescând destul de rapid după ce aproximativ jumătate din compus a fost adăugat lăsând temperatura să ajungă la 5°C (reacția devine destul de groasă și apoi se subțiază încet). Reacția este apoi agitată la 0°C timp de 10 min, înainte de a fi încălzită la temperatura ambiantă timp de 1 oră și agitată la temperatura ambiantă timp de 1 oră suplimentară. Amestecul de reacție a fost răcit la aproximativ 6°C și soluția apoasă saturată de clorură de amoniu (NH<sub>4</sub>Cl, 2,2 L) a fost adăugată cu o creștere de temperatură până la 25°C. Amestecul a fost agitat timp de 5 minute înainte de a fi diluat cu toluen (10 L). Straturile au fost separate (o cantitate mare de solid este prezentă în stratul apos) și stratul organic a fost spălat secvențial cu apă (6 × 2,2 L) și saramură (2 × 2,2 L) înainte de a fi uscat pe sulfat de sodiu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Reactivul de uscare, sulfat de sodiu (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a fost îndepărtat prin filtrare și soluția a fost concentrată sub presiune redusă. Toluenuul rezidual a fost coevaporat cu *n*-heptan pentru a da 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1, 90,3 g, 164,9 g teoretic, 54,8%) ca solid alb. Pentru 1: <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,08 (bs, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 1,23 (s, 12H) ppm; C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>BN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 194,04), LCMS (EI) *m/e* 195 (M<sup>+</sup> + H).

**Exemplul 6. Sinteză alternativă de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol**

**Schema VI**



**4-Bromopirazol (22).** Pirazolul (19, 34,0 g, 0,5 mol) și NBS (89,0 g, 0,5 mol, 1,0 echiv) au fost suspendate în apă (625 ml) la temperatura ambiantă. Suspensia rezultată a fost agitată la temperatura ambiantă peste noapte. Amestecul de reacție a fost apoi extras cu EtOAc (2 × 100 mL). Extractele EtOAc combinate au fost spălate cu Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apoasă și saramură, uscate pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, și concentrate sub presiune redusă pentru a da 4-bromopirazol brut (72,0 g, 73,5 g teoretic, randament 98%) ca solid alb (GC puritate: >98%), care a fost utilizat direct în reacția ulterioară fără purificare suplimentară.

**4-Bromo-1-(etoxietil)-1H-pirazol (23).** La o soluție de 4-bromopirazol (70,0 g, 0,476 mol) în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL) s-au adăugat o soluție de 3,1 M HCl în dioxan (4 mL) și etil vinil eter (41 g, 0,569 mol, 1,2 echiv) la temperatura ambiantă. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura

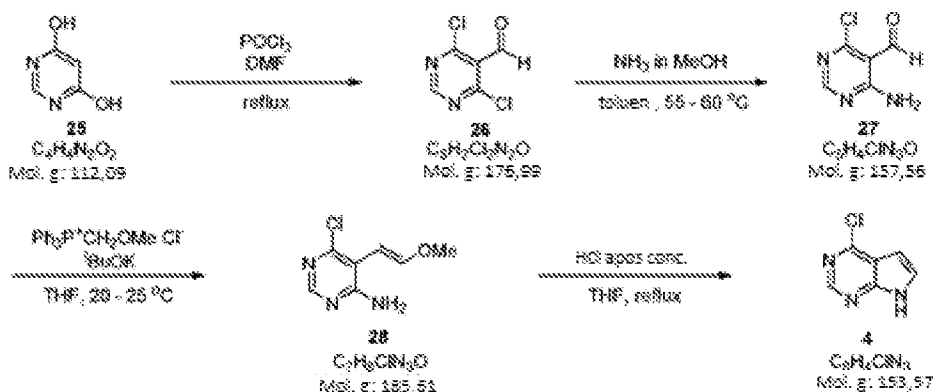
ambiantă timp de 3 ore. Reacția a fost stinsă cu  $\text{NaHCO}_3$  apoasă și cele două straturi au fost separate. Stratul organic a fost spălat cu apă, uscat pe  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , și concentrat sub presiune redusă la sec pentru a da 4-bromo-1-(etoxietil)-1*H*-pirazol (113 g, 104,3 g teoretic, randament 97%) ca un ulei (GC puritate: 89%), care a fost utilizat direct în reacția ulterioară fără purificare suplimentară.

5 **1-(Etoxietyl)-4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (24).** La 100 ml soluție de  $i\text{PrMgCl}\cdot\text{LiCl}$  (50 mmol, 1,8 echiv) în THF s-a adăugat 4-bromo-1-(etoxietil)-1*H*-pirazol (6,15 g, 28 mmol) la temperatura ambiantă. Amestecul de reacție rezultat a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 12 ore și apoi răcit la  $-20^\circ\text{C}$ . S-a adăugat apoi metoxi pinacolborat (10,6 g, 67 mmol, 2,4 echiv) la amestecul de reacție la  $-20^\circ\text{C}$ . Amestecul rezultat a fost agitat la  $0-10^\circ\text{C}$  timp de 1 oră. S-a adăugat  $\text{NH}_4\text{Cl}$  apos pentru a stinge reacția. Amestecul a fost apoi extras cu eter de petrol (PE). Extractele PE combinate au fost spălate cu  $\text{NaHCO}_3$  saturată, uscate pe  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  și concentrate sub presiune redusă. Produsul brut a fost cristalizat în PE pentru a da 1-(etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**24**, 4,2 g, 7,45 g teoretic, randament 56,4%) ca solid alb până la alburii (puritate GC: 99%). Pentru **24**:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  8,09 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 5,55 (q, 1H,  $J = 6,1$  Hz), 3,37 (dq, 1H,  $J = 7,1, 9,6$  Hz), 3,12 (dq, 1H,  $J = 7,0, 9,7$  Hz), 1,56 (d, 3H,  $J = 6,0$  Hz), 1,24 (s, 12H), 1,00 (t, 3H,  $J = 7,0$  Hz) ppm;  $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{BN}_2\text{O}_3$  (MW, 266,14), LCMS (EI)  $m/e$  267 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

20 **4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (1).** La un amestec de 2,3-dimetilbutane-2,3-diol (25,0 kg, 211,6 mol) și 1-(1-etoxietyl)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**24**, 55,0 kg, 206,7 mol) în 1,2-dicloroetan (750 kg) s-a adăugat încet o soluție de HCl în MTBE (25,0 kg, 20-30% de HCl) la  $0-5^\circ\text{C}$ . Amestecul de reacție rezultat a fost apoi agitat la  $10-20^\circ\text{C}$  timp de 3-5 ore. După deprotejarea selectivă, reacția a fost completă după cum s-a monitorizat prin HPLC (1: sub 1%), amestecul de reacție a fost degazat și reumplut cu azot înainte de a fi răcit la  $-15^\circ\text{C}$ . La amestecul de reacție răcit s-a adăugat apoi trietilamină (TEA, 30,0 kg, 296,5 mol) pentru a ajusta pH-ul la 7-8. Amestecul a fost apoi încălzit gradual la temperatura ambiantă înainte de a fi tratat cu apă (150 kg). Cele două faze au fost separate și stratul organic a fost spălat cu saramură (60 kg) și uscat pe sulfat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Reactivul de uscare, sulfatul de sodiu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), a fost îndepărtat prin filtrare și soluția rezultată a fost concentrată sub presiune redusă la  $40-50^\circ\text{C}$  la un ulei gros. Reziduul a fost încălzit la  $60-70^\circ\text{C}$  și diluat cu eter de petrol (100 kg) la aceeași temperatură. Amestecul rezultat a fost apoi răcit gradual la temperatura ambiantă și ulterior la  $-5^\circ\text{C}$  și agitat la aceeași temperatură timp de 3 ore. Solidele au fost colectate prin centrifugare și uscate la  $50-60^\circ\text{C}$  sub vid pentru a da produsul brut dorit (1, 33,75 kg, 40,11 kg teoretic, 84,1%). Produsul brut dorit a fost apoi suspendat în 1,2-dicloroetan (30 kg) și amestecul rezultat a fost încălzit la reflux până când s-a format o soluție clară. La soluția fierbinte s-a adăugat apoi eter de petrol (150 kg) la aceeași temperatură. Amestecul rezultat a fost apoi răcit gradual la temperatura ambiantă și ulterior la  $-5^\circ\text{C}$  și agitat la aceeași temperatură timp de 3 ore. Solidele au fost colectate prin centrifugare și uscate sub vid la  $50-60^\circ\text{C}$  pentru a da 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**1**, 31,0 kg, 40,11 kg teoretic, 77,3%) ca un solid alburii, care este identic în fiecare aspect comparabil cu materialul sintetizat prin metoda sintetică cum s-a descris mai sus în Exemplul 5.

40 **Exemplul 7. Sinteză de 4-cloro-7H-[pirolo[2,3-d]pirimidină**

**Schema VII**



45 **4,6-Dicloropirimidin-5-carbaldehidă (26).** Într-un flacon de 5 L cu 4 găuri echipat cu un agitator mecanic, o pâlnie de adăugare, un condensator, un termocuplu, și o baieiere cu  $\text{N}_2$  într-o soluție apoasă de spălare NaOH, a fost încărcată și răcită oxiclură de fosfor ( $\text{POCl}_3$ , 1 L, 10,572 mol, 4,82 echiv) într-o baie cu gheață/sare. S-a adăugat apoi în picătură *N,N*-dimetilformamidă (DMF, 320 mL,

4,138 mol, 1,85 echiv) la flacon la  $0 \pm 2^\circ\text{C}$ . După adăugarea a aproximativ 100 mL de DMF timp de aproximativ 0,5 ore, cristalizarea a avut loc și temperatura reacției a crescut de la 0 până la  $10^\circ\text{C}$ . Adăugarea a fost oprită și amestecul a fost lăsat să se răcească până la aproximativ  $2^\circ\text{C}$ . DMF rămas a fost adăugat timp de 2,5 ore sub  $8^\circ\text{C}$ . Suspensia a devenit foarte groasă făcând agitarea dificilă. Când adăugarea de DMF a fost completă, amestecul a fost agitat la  $3-5^\circ\text{C}$  timp de 0,5 ore. S-a adăugat în porții 4,6-dihidroxipirimidină (250 g, 2,232 mol) ca solid. După aceea, s-a adăugat aproximativ o treime de 4,6-dihidroxipirimidină, amestecul de reacție a devenit mai mobil, și a avut loc un fenomen exotermic lent cu temperatura reacției crescând până la aproximativ  $12^\circ\text{C}$  în 0,5 ore. 4,6-Dihidroxipirimidină rămasă a fost adăugată în porții timp de 0,25 ore cu temperatura reacției crescând de la 12 până la  $27^\circ\text{C}$ . Temperatura reacției a fost menținută la  $25-27^\circ\text{C}$  cu răcirea intermitentă, timp care timp suspensia galbenă a devenit mai subțire, apoi s-a mai îngroșat o dată din nou. După ce fenomenul exotermic s-a domolit în aproximativ 1 oră, amestecul de reacție a fost încălzit încet. La aproximativ  $55^\circ\text{C}$ , amestecul de reacție a devenit extrem gros și a avut loc al doilea fenomen exotermic ușor. Mantaua de încălzire a fost îndepărtată în timp ce temperatura reacției a continuat să crească până la aproximativ  $63^\circ\text{C}$  și a rămas la această temperatură timp de câteva minute înainte de a scădea. Încălzirea amestecului a fost reluată până când s-a obținut un reflux ușor (aproximativ  $100^\circ\text{C}$ ). La aproximativ  $95^\circ\text{C}$  a început o evoluție constantă, destul de rapidă a gazului de HCl și amestecul de reacție s-a subțiat și închis la culoare gradual. După aproximativ 0,5 ore, s-a dezvoltat o soluție maro clară cu temperatura de reflux crescând încet până la  $115^\circ\text{C}$  timp de 1,25 ore. După un total de 2,5 ore la reflux, amestecul de reacție a fost răcit la temperatura ambiantă și agitat peste noapte la temperatura ambiantă. Cantitatea în exces de  $\text{POCl}_3$  (cât de mult posibil) a fost îndepărtată sub presiune redusă (temperatura băii  $45-50^\circ\text{C}$ ). Uleiul rezidual maro gros a fost turnat foarte încet în  $\text{H}_2\text{O}$  rece (5 L) într-o pâlnie de separare de 20 L, adăugând gheață după cum este necesar pentru a menține amestecul apos aproape de temperatura camerei. Amestecul apos a fost extras cu EtOAc ( $2 \times 3$  L urmat de  $1 \times 2$  L). Extractele EtOAc combinate au fost spălate cu  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 2,5$  L), soluție apoasă saturată de  $\text{NaHCO}_3$  (1 L), saramură (1 L), uscate pe  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrate, și concentrate sub presiune redusă (temperatura băii la  $35^\circ\text{C}$ ) pentru a da 4,6-dicloropirimidin-5-carbaldehidă brută (270 g, 395 g teoretic, 68,4%) ca solid galben-portocaliu. O porțiune de 20 g din acest material brut a fost purificată prin distilare Kugelrohr (temperatura cuptorului la  $90-100^\circ\text{C}$ , 225 mTorr) pentru a da 15,3 g de 4,6-dicloropirimidin-5-carbaldehidă pură ca solid alb care a devenit galben când a stat la temperatura camerei.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,46 (s, 1H), 8,89 (s, 1H) ppm.

**4-Amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidă (27).** O soluție de 7 M  $\text{NH}_3$  în MeOH (265 mL, 1,855 mol, 2,0 echiv) a fost adăugată timp de 1,25 ore la o soluție de 4,6-dicloropirimidin-5-carbaldehidă (163,7 g, 0,9301 mol) în toluen (3 L) la temperatura ambiantă. Temperatura reacției a crescut încet de la 20 până la  $26^\circ\text{C}$  și s-a format o suspensie galbenă. Răcirea ușoară a fost aplicată pentru a menține temperatura reacției sub  $26^\circ\text{C}$ . Suspensia a fost agitată la temperatura ambiantă timp de 3,5 ore înainte ca solidele să fie colectate prin filtrare. Solidele au fost spălate cu EtOAc (1 L). Filtratul a fost concentrat sub presiune redusă, și solidele au fost triturate cu toluen și *n*-heptan (2:1 v/v, 600 mL), filtrate și uscate pentru a da 71,1 g de 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidă ca solid galben. Solidul original filtrat din amestecul de reacție a conținut o cantitate suplimentară de 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidă. Produsul a fost extras din solidul filtrat prin agitare în EtOAc (1,25 L) timp de 1,5 ore, filtrare, apoi agitare în THF (750 mL) timp de 1 oră și din nou filtrare. Ambele filtrate EtOAc și THF au fost concentrate sub presiune redusă, și solidele rezultate au fost triturate cu toluen și *n*-heptan (2:1 v/v, 450 mL), filtrate și uscate pentru a da 44,1 g suplimentare de 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidă ca solid galben. Randamentul combinat al 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidei (115,2 g, 146,5 g teoretic) a fost 78,6%.  $^1\text{H}$ NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10,23 (s, 1H), 8,71 (bs, 1H), 8,55 (bs, 1H), 8,39 (s, 1H) ppm;  $\text{C}_5\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}$  (MW, 157,56), LCMS (EI) *m/e* 158 ( $\text{M}^+ + \text{H}$ ).

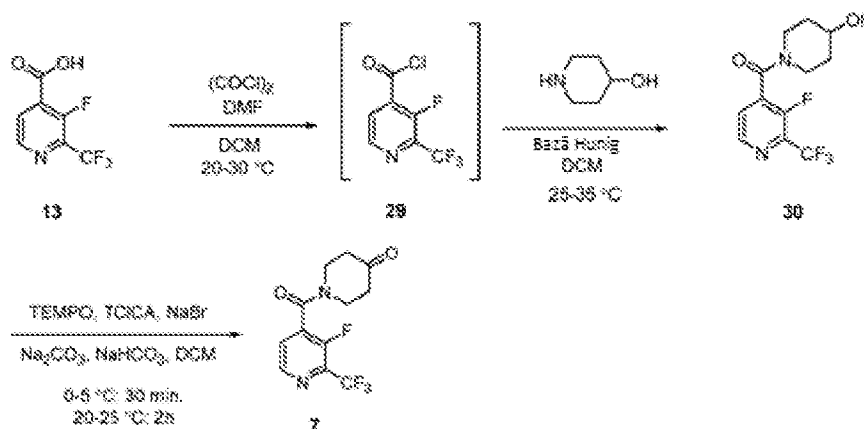
**6-Cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamină (28).** O suspensie de clorură de (metoximetil)trifenilfosfoniu (276,0 g, 0,807 mol, 1,1 echiv) în THF (1,5 L) a fost răcită într-o baie cu gheață/sare la  $-2^\circ\text{C}$  și s-a adăugat 1 M terț-butoxid de potasiu (KO<sup>t</sup>Bu) în THF (807 mL, 0,807 mol, 1,1 echiv) timp de 1,5 ore la  $-2$  până la  $-3^\circ\text{C}$ . Amestecul roșu închis-portocaliu a fost agitat la  $-2$  până la  $-3^\circ\text{C}$  timp de 1 oră. S-a adăugat apoi în porții 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbaldehidă (115,2 g, 0,7338 mol, 1,0 echiv) la amestecul de reacție ca formă solidă utilizând THF (200 mL) pentru a clăti recipientul și pâlnia. În timpul adăugării, temperatura reacției a crescut de la  $-3$  până la  $13^\circ\text{C}$  și a dezvoltat o culoare maro. Când temperatura reacției a scăzut la  $10^\circ\text{C}$ , baia de răcire a fost îndepărtată și amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la temperatura ambiantă și s-a agitat la temperatura ambiantă timp de 42 ore. Amestecul de reacție a fost răcit la  $-2^\circ\text{C}$  înainte de a fi stins prin adăugarea lentă de soluție apoasă saturată de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (750 mL). Amestecul a fost concentrat sub presiune redusă pentru a îndepărta majoritatea THF. Reziduu a fost partiționat între EtOAc (3 L) și  $\text{H}_2\text{O}$  (1 L). Faza organică a fost filtrată pentru a îndepărta materialul insolubil la interfață, apoi a fost extrasă cu 2 N HCl ( $4 \times 250$

mL) urmată de 3 N HCl (2 × 250 mL). Extractele de HCl combinate au fost extrase înapoi cu EtOAc (500 mL) apoi filtrate prin Celite pentru a îndepărta materialul insolubil. Filtratul a fost răcit într-o baie cu gheață/saramură, ajustat la pH 8 cu 6 N soluție apoasă de NaOH și extras cu EtOAc (3 × 1 L). Extractele EtOAc combinate au fost spălate cu saramură (1 L), uscate pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agitate cu cărbune (10 g) și gel de siliciu (10 g) timp de 1 oră. Amestecul a fost filtrat prin Celite, spălând stratul de celite cu EtOAc (1 L). Filtratul a fost concentrat, coevaporând rezidual EtOAc cu *n*-heptan (500 mL). Solidul cafeniu rezultat a fost pompat sub vid înaintat timp de 2 ore pentru a da 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamina brută (72,3 g, 136,2 g teoretic, 53,1%). Produsul brut dorit a fost utilizat în următoarele reacții fără purificare suplimentară. O mostră de produs brut (2,3 g) a fost purificată prin cromatografie pe coloană cu gel de siliciu, eluând cu 0 - 35% EtOAc/*n*-heptan pentru a da 1,7 g de 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamină pură ca solid alb, care a fost găsit ca fiind un amestec de 1 până la 2 izomeri *E/Z*. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) pentru *E*-izomer: δ 8,02 (s, 1H), 7,08 (bs, 2H), 6,92 (d, 1H, *J* = 13,1), 5,35 (d, 1H, *J* = 13,0 Hz), 3,68 (s, 3H) ppm și pentru *Z*-izomer: δ 8,06 (s, 1H), 7,08 (bs, 2H), 6,37 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 5,02 (d, 1H, *J* = 6,7 Hz), 3,69 (s, 3H) ppm; C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O (MW, 185,61), LCMS (EI) *m/e* 186/188 (M<sup>+</sup> + H).

**4-Cloro-7H-[pirolo[2,3-*d*]pirimidină (4).** S-a adăugat HCl concentrat (5 mL) la o soluție de 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamină brută (70,0 g, 0,3784 mol) în THF (700 mL) și amestecul de reacție rezultat a fost încălzit la reflux timp de 7,5 ore. Pe încălzirea s-a format o suspensie ușoară care gradual s-a redizolvat. Când reacția a fost considerată completă cum s-a monitorizat prin HPLC, amestecul de reacție a fost răcit la temperatura ambiantă și agitat la temperatura ambiantă peste noapte. S-a adăugat NaHCO<sub>3</sub> solid (15 g) la amestecul de reacție și amestecul rezultat a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 1 oră. S-au adăugat cărbune (7 g), gel de siliciu (7 g) și Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 g) și amestecul a fost încălzit la 40°C timp de 1 oră. Amestecul a fost apoi răcit la temperatura ambiantă și filtrat prin Celite, spălând stratul de celite cu THF (1 L). Filtratul a fost concentrat sub presiune redusă și solidul rezultat a fost uscat sub presiune redusă pentru a da 4-cloro-7H-[pirolo[2,3-*d*]pirimidina brută (4, 58,1 g, 58,1 g teoretic, 100%) ca solid galben-marou. Acest produs brut dorit a fost dizolvat în EtOAc (1 L) la 50-55°C și tratat cu cărbune activat (3 g). Amestecul a fost filtrat în timp ce este cald prin Celite și stratul de celite a fost spălat cu EtOAc cald (250 mL). Filtratul a fost concentrat până la aproximativ 500 mL și suspensia a fost lăsată să stea la temperatura ambiantă peste noapte. Suspensia a fost ulterior răcită la 0-5°C timp de 2 ore înainte ca solidele să fie colectate prin filtrare. Solidele au fost uscate pentru a da 4-cloro-7H-[pirolo[2,3-*d*]pirimidină pură (4, 54,5 g, 58,1 g teoretic, 94%) ca cristale galben-marou. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,58 (bs, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,69 (d, 1H, *J* = 3,5 Hz), 6,59 (d, 1H, *J* = 3,5 Hz) ppm; LCMS (EI) *m/e* 154/156 (M<sup>+</sup> + H).

**Exemplul 8. Sinteză alternativă de 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil) piperidin-4-onă (7)**

**Schema VIII**



**Etapa 1: (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(4-hidroxipiperidin-1-il) metanonă (30).** La o soluție de acid 3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinic (13) (54,01 g, 258,3 mmol) în diclorometan (270 mL) s-a adăugat *N,N*-dimetilformamidă (0,34g, 4,65 mmol) la temperatura camerei. La această soluție s-a adăugat clorură de oxalil (34,41 g, 271,2 mmol) în diclorometan (81 ml) în 30 minute prin pâlnie de adăugare în timp ce temperatura internă a fost menținută la 15 până la 25°C. Pâlnia de adăugare a fost clătită cu diclorometan (27 mL). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de două ore pentru a da o soluție marou. Diclorometanul a fost distilat la o temperatură de 30°C sub presiune redusă. Reziuul a fost dizolvat în diclorometan (270 mL) și solventul a fost distilat sub presiune redusă la 30°C. Reziuul rezultat a fost dizolvat în diclorometan (270 mL) pentru a da o soluție de diclorometan de clorură de 3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil (29). La un alt flacon s-a adăugat

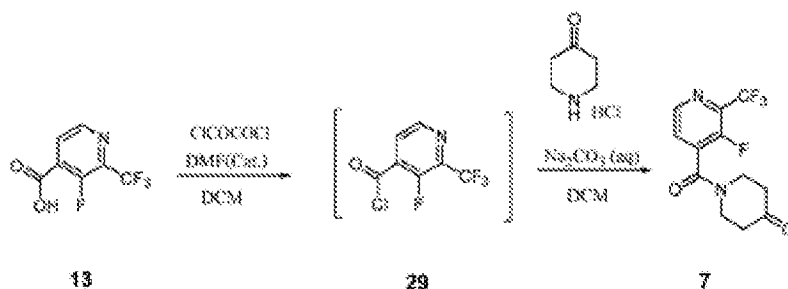
4-hidroxipiperidină (33,18 g, 328 mmol), diclorometan (270 mL), și *N,N*-diizopropiletilamină (108 mL, 619,9 mmol). Amestecul a fost încălzit la 33°C pentru a forma o soluție. Amestecul a fost răcit la temperatura camerei. La soluție s-a adăugat clorura de 3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil (29) în diclorometan la o temperatură de 25 până la 35°C. După adăugare, amestecul a fost agitat la 25 până la 35°C timp de o altă oră. La un recipient s-a adăugat apă (430 mL) și acid clorhidric 37% (62,4 g (633 mmol). Acidul clorhidric diluat a fost adăugat la amestecul de reacție la temperatura internă sub 25°C. După agitarea amestecului timp de 30 minute, faza organică a fost colectată prin separare. Faza organică a fost spălată cu 9,5% saramură (210 g). Faza apoasă a fost combinată și extrasă cu diclorometan (430 mL). Fazele organice au fost combinate și spălate cu 4,5% saramură (210 ml) și apă (215 mL). Diclorometanul a fost îndepărtat prin schimbarea solventului în 2-metoxi-2-metilpropan (TBME). Reziduul din TBME (135 mL) a fost încălzit la 60°C timp de 1 oră. Amestecul a fost răcit gradual la 0°C pentru a cristaliza (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(4-hidroxipiperidin-1-il) metanonă. Amestecul a fost filtrat și turta umedă a fost spălată cu TBME (27 mL). Solidele au fost uscate la 50°C pentru a da (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(4-hidroxipiperidin-1-il)metanonă (**30**) (69,95 g, 92%) ca solid maro deschis. HPLC-MS: 293,0 (M+H). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3,09 - 3,99 (m, 4H); 1,37 - 1,80 (m, 4H); 3,75 (m, 1H); 4,84 (d, 1H (b)); 8,65 (d, 1H, J = 4,7Hz); 7,89 (dd, 1H, J = 4,7, J = 4,7 Hz). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 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. C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW 292,23), LCMS (EI) *m/e* 293,0 (M<sup>+</sup> + H). Purity compusului 30 prin acest procedeu a fost determinată ca fiind mai mare de aproximativ 98% după cum s-a măsurat prin HPLC.

**Etapa 2: 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7).** La un flacon s-a adăugat (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(4-hidroxipiperidin-1-il) metanonă (30) (50 g, 171,1 mmol), diclorometan (733 mL), apă (766 mL), bicarbonat de sodiu (71,4 g, 849,7), carbonat de sodiu 99,1 g, 85,2 mmol), bromură de sodiu (1,76 g, 17,1 mmol), și 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoloxi (TEMPO) (0,535 g, 3,42 mmol) la 15 până la 25°C. Amestecul a fost răcit la 0 până la 5°C. La amestec s-a adăugat 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinane-4,4,6-trionă (23,8 g, 102 mmol) în patru porții timp de 10 minute. Amestecul a fost agitat la 0 până la 5°C timp de 30 minute și apoi amestecul a fost încălzit la 20 până la 25°C în 30 minute. După agitarea amestecului la 20 până la 25°C timp de o altă oră, reacția a fost stinsă prin adăugarea de metanol (26,23 mL, 647,5 mmol) la 20 până la 25°C. Amestecul a fost agitat timp de 20 minute și filtrat pe pat de celite. Patul de celite (20 g) a fost spălat cu diclorometan (50 mL). Faza organică a fost separată. Faza organică a fost spălată secvențial cu 6% saramură (266 g) și apă (250 mL). S-a adăugat cărbune activat (3,5 g) la faza organică. După agitarea amestecului la temperatura camerei timp de 30 minute, el a fost filtrat pe pat de celite (20 g). Patul filtrat a fost spălat cu diclorometan (50 mL). Diclorometanul a fost îndepărtat prin schimbarea solventului în 2-metoxi-2-metilpropan (TBME) și reziduul din TBME (180 mL) a fost încălzit la 50 până la 60°C. S-a adăugat gradual heptan (500 mL) la amestecul cald (500 mL) în timp ce temperatura internă a fost menținută peste 50°C pentru a cristaliza produsul. Amestecul a fost răcit gradual la 10°C și filtrat. Turta umedă a fost spălată cu heptan (2 × 75 mL). Solidele au fost uscate sub presiune redusă pentru a da 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7) (49,7 g, randament 87,9%) ca solid albicios până la maro : <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69 Hz, 1H, NCH în piridină), 7,97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4,69 Hz, 1H, NCCH în piridină), 3,92 (br s, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din un alt NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în poziție axială), 3,54 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din un alt NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în poziție ecuatorială), 2,48 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,44 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>), 2,34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>) ppm; <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-C=O), 151,26 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266,89 Hz, C-F), 146,90 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 6,05 Hz, NCH în piridină), 135,56 (C-C=O), 134,78 -135,56 (m, NCCF<sub>3</sub>), 128,27 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 7,19 Hz, NCCH în piridină), 119,52 (d × cvartet, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274,38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4,89 Hz, CF<sub>3</sub>), 45,10 (NC în inelul de piperidină) ppm, un carbon (NCC în inelul de piperidină) lipsind din cauza suprapunerii cu (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; <sup>19</sup>F RMN (282 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -64,58 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, F<sub>3</sub>C), -128,90 (d × cvartet, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4,05 Hz, FC) ppm; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 290,21), LCMS (EI) *m/e* 291,1 (M<sup>+</sup> + H). Purity compusului 7 prin acest procedeu a fost determinată ca fiind între aproximativ 90% și aproximativ 96% după cum s-a măsurat prin HPLC.

Se observă că utilizarea crescută a unui agent de oxidare (de exemplu, TEMPO) poate conduce la creșterea formării de impurități și la scăderea randamentului de izolare. Timpii de oxidare mai lungi pot de asemenea conduce la creșterea formării de impurități și la scăderea randamentului de izolare.

**Exemplu 9. Sinteză alternativă de 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil) piperidin-4-onă (7)**

Schema IX



**1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7).** La o soluție de acid 3-fluoro-

2-(trifluorometil)izonicotinic (13) (20 g, 96,65 mmol) în diclorometan (150 mL) s-a adăugat *N,N*-  
 5 dimetilformamidă (0,13g, 1,72 mmol) la temperatura camerei. La această soluție s-a adăugat clorură de  
 oxalil (12,75 g, 100,4 mmol) în diclorometan (40 ml) în 30 minute prin pâlnie de adăugare în timp ce  
 temperatura internă a fost menținută la 15 până la 25°C. Pâlnia de adăugare a fost clătită cu  
 diclorometan (10 mL). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore pentru a da o  
 soluție maro de intermediar clorură de 3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil. La soluție s-a încărcat  
 10 clorhidrat monohidrat de 4-piperidonă (19,1 g, 124,3 mmol). Amestecul a fost răcit la 0 până la 5°C și  
 s-a adăugat o soluție apoasă de carbonat de sodiu (20,28 g, 191,3 mmol) în apă (200 mL). După  
 adăugare, amestecul a fost încălzit la temperatura camerei și agitat timp de 2 ore. Faza organică a fost  
 separată și spălată secvențial cu 6% saramură (110 g) și apă (100 mL). La faza organică s-a adăugat  
 15 cărbune activat (1,4 g). După agitarea amestecului la temperatura camerei timp de 60 minute, amestecul  
 a fost filtrat pe pat de celite (5 g). Patul filtrat a fost spălat cu diclorometan (40 mL). Diclorometanul a  
 fost îndepărtat prin schimbarea solventului în 2-metoxi-2-metilpropan (TBME) și reziduu în TBME  
 (100 mL) a fost încălzit la 50 până la 60°C. S-a adăugat gradual heptan (250 mL) la amestecul cald în  
 timp ce s-a menținut temperatura internă peste 50°C pentru a cristaliza produsul. Amestecul a fost răcit  
 20 gradual la 10°C și filtrat. Turta umedă a fost spălată cu heptan (2 × 40 mL). Solidele au fost uscate sub  
 presiune redusă pentru a da 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)izonicotinoil)piperidin-4-onă (7) (25,8 g,  
 20 randament 92,7%) ca solid albicios până la maro. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69  
 Hz, 1H, NCH în piridină), 7,97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,69 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4,69 Hz, 1H, NCCH în piridină), 3,92 (br s,  
 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din un alt NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în  
 poziție axială), 3,54 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, unul din NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, unul din un alt  
 25 NCH<sub>2</sub> în inelul de piperidină, ambele în poziție ecuatorială), 2,48 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,44 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>), 2,34  
 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,15 Hz, 2H, NCCH<sub>2</sub>) ppm; <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 207,17 (C=O), 161,66 (N-  
 C=O), 151,26 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 266,89 Hz, C-F), 146,90 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub> = 6,05 Hz, NCH în piridină), 135,56 (C-C=O),  
 134,78 -135,56 (m, NCCF<sub>3</sub>), 128,27 (d, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 7,19 Hz, NCCH în piridină), 119,52 (d × cvartet, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> =  
 274,38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4,89 Hz, CF<sub>3</sub>), 45,10 (NC în inelul de piperidină) ppm, un carbon (NCC în inelul de  
 30 piperidină) lipsind din cauza suprapunerii cu (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO; <sup>19</sup>F RMN (282 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -64,58  
 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, F<sub>3</sub>C), -128,90 (d × cvartet, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub> = 15,85 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4,05 Hz, FC) ppm;  
 C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MW, 290,21), LCMS (EI) *m/e* 291,1 (M<sup>+</sup> + H). Puritya compusului 7 prin acest  
 procedeu a fost determinată ca fiind mai mare de aproximativ 99% după cum s-a măsurat prin HPLC.

**Exemplul A: Test kinază JAK *in vitro***

35 Compusul cu Formula I a fost testat pentru activitate inhibitoare a țintelor JAK în conformitate  
 cu următorul test *in vitro* descris în Park și colab., Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104.  
 Domeniile catalitice ale JAK1 uman (a.a. 837-1142) și JAK2 (a.a. 828-1132) cu o etichetă His la N-  
 terminal au fost exprimate utilizând baculovirus în celule de insecte și purificate. Activitatea catalitică a  
 JAK1 și JAK2 a fost testată prin măsurarea fosforilării unei peptide biotinate. Peptida fosforilată a fost  
 40 detectată prin fluorescență omogenă rezolvată în timp (HTRF). Valorile IC<sub>50</sub> ale compușilor au fost  
 măsurate pentru fiecare kinază în reacții de 40 microL care conțin enzima, ATP și 500 nM peptidă în 50  
 mM tampon Tris (pH 7,8) cu 100 mM NaCl, 5 mM DTT, și 0,1 mg/mL (0,01%) BSA. Pentru 1 mM  
 masuratori ale IC<sub>50</sub>, concentrația de ATP în reacții a fost 1 mM. Reacțiile au fost efectuate la  
 temperatura camerei timp de 1 oră și apoi au fost oprite cu 20 μL 45 mM EDTA, 300 nM SA-APC, 6  
 45 nM Eu-Py20 în tampon de testare (Perkin Elmer, Boston, MA). Legarea la anticorpusul marcat cu Europiu  
 a avut loc timp de 40 minute și semnalul HTRF a fost măsurat pe un cititor de placă Fusion (Perkin  
 Elmer, Boston, MA). Compusul cu Formula I și sarea de acid adipic au avut un IC<sub>50</sub> la JAK1 de ≤ 5 nM  
 (măsurat la 1 mM ATP) cu un raport JAK2/JAK1 de > 10 (măsurat la 1 mM ATP).

**Exemplul B: Teste celulare**

50 Liniile celulare de cancer dependente de citokine și prin urmare transducția semnalului  
 JAK/STAT, pentru creștere, pot fi placate la 6000 celule pe godeu (format de placă cu 96 godeuri) în  
 RPMI 1640, 10% FBS, și 1 nG/mL de citokine adecvate. Compușii pot fi adăugați la celule în

DMSO/mediu (concentrație finală 0,2% DMSO) și incubăți timp de 72 ore la 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Efectul compusului asupra viabilității celulare este evaluat utilizând testul de viabilitate celulară luminescent CellTiter-Glo (Promega) urmat de cuantificarea TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Potențialele efecte în afara țintei ale compușilor sunt măsurate în paralel utilizând o linie celulară condusă non-JAK cu aceeași citire a testului. Toate experimentele sunt efectuate de obicei în duplicate.

Liniile celulare de mai sus pot fi de asemenea utilizate pentru a examina efectele compușilor asupra fosforilării kinazelor JAK sau potențial a substraturilor în aval cum ar fi proteinele STAT, Akt, Shp2, sau Erk. Aceste experimente pot fi efectuate după o înfometare a citokinelor peste noapte, urmată de o scurtă preincubare cu compus (2 ore sau mai puțin) și stimularea citokinelor de aproximativ 1 oră sau mai puțin. Proteinele sunt apoi extrase din celule și analizate prin tehnici familiare celor calificați în domeniu incluzând colorare Western sau ELISA utilizând anticorpi care pot diferenția între proteina fosforilată și totală. Aceste experimente pot utiliza celule normale sau canceroase pentru a investiga activitatea compușilor asupra biologiei supraviețuirii celulei tumorale sau asupra mediatorilor bolii inflamatorii. De exemplu, cu privire la cei din urmă, citokinele cum ar fi IL-6, IL-12, IL-23, sau IFN pot fi utilizate pentru a stimula activarea JAK conducând la fosforilarea proteinei STAT și potențial în profilurile transcripționale (evaluate prin matrice sau tehnologie qPCR) sau producția și/sau secreția proteinelor, cum ar fi IL-17. Abilitatea compușilor de a inhiba aceste efecte mediate de citokine poate fi măsurată utilizând tehnici comune celor calificați în domeniu.

Compușii de aici pot fi de asemenea testați în modele celulare concepute pentru a evalua potența și activitatea lor împotriva JAK-urilor mutante, de exemplu, mutația JAK2V617F găsită în tulburările proliferative mieloidale. Aceste experimente utilizează adesea celule dependente de citokine de descendență hematologică (*de exemplu* BaF/3) în care kinazele mutante de tip sălbatic sau JAK sunt exprimate ectopic (James, C., și colab. Nature 434:1144-1148; Staerk, J., și colab. JBC 280:41893-41899). Obiectivele finale includ efectele compușilor asupra supraviețuirii celulei, proliferării, și proteinelor fosforilate JAK, STAT, Akt, sau Erk.

Anumiți compuși de aici pot fi evaluați pentru activitatea lor inhibând proliferarea celulelor T. Un astfel de test poate fi considerat un al doilea test de proliferare condus de citokine (*adică* JAK) și de asemenea un test simplist de supresie imună sau inhibare a activării imune. Mai jos este o scurtă prezentare a modului cum pot fi efectuate astfel de experimente. Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) sunt preparate din probe de sânge integral uman utilizând metoda Ficoll Hypaque de separare și celulele T (fracțiunea 2000) pot fi obținute de la PBMC prin elutriere. Proaspăt izolatele celule T umane pot fi menținute în mediul de cultură (RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 U/ml penicilină, 100 μg/ml streptomycină) la o densitate de  $2 \times 10^6$  celule/ml la 37°C timp de până la 2 zile. Pentru analiza de proliferare celulară stimulată cu IL-2, celulele T sunt tratate mai întâi cu Phytohemagglutinin (PHA) la o concentrație finală de 10 μg/mL timp de 72 ore. După spălarea o dată cu PBS, 6000 celule/godeu sunt placate în plăci cu 96 de godeuri și tratate cu compuși la diferite concentrații în mediul de cultură în prezența a 100 U/mL IL-2 uman (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel). Plăcile sunt incubate la 37°C timp de 72 ore și indicele de proliferare este evaluat utilizând reactivi luminescenți CellTiter-Glo urmând protocolul sugerat de fabricant (Promega; Madison, WI).

#### **Exemplul C: Eficacitate anti-tumorală *in vivo***

Compușii de aici pot fi evaluați în modele de xenogrefă tumorale umane la șoarecii compromiși imun. De exemplu, o variantă tumorigenă a liniei celulare de plasmocitom INA-6 poate fi utilizată pentru a inocula șoarecii SCID subcutanat (Burger, R., și colab. Hematol J. 2:42-53, 2001). Animalele care poartă tumoarea pot fi apoi randomizate în grupurile de tratament cu medicament sau cu vehicul și diferite doze de compuși pot fi administrate în orice număr pe căile uzuale incluzând oral, i.p., sau perfuzie continuă utilizând pompe implantabile. Creșterea tumorii este urmărită în timp utilizând șublere. Mai departe, mostrele din tumoare pot fi recoltate la orice moment după inițierea tratamentului pentru analiză cum s-a descris mai sus (Exemplul B) pentru a evalua efectele compusului asupra activității JAK și a căilor de semnalizare în aval. În plus, selectivitatea compusului poate fi evaluată utilizând modele de xenogrefe tumorale care sunt conduse de alte kinaze cunoscute (*de exemplu* Bcr-Abl) cum ar fi modelul tumoral K562.

#### **Exemplul D: Test de răspuns la hipersensibilitate întârziată la contactul cu pielea murină**

Compușii de aici pot fi de asemenea testați pentru eficacitățile lor (de inhibarea țintelor JAK) în modelul de testare al hipersensibilității întârziată murine conduse de celulele T. Răspunsul de hipersensibilitate de tip întârziat la contactul cu pielea murină (DTH) este considerat a fi un model valid de dermatită clinică de contact, și al altor tulburări imunitare mediate de limfocitele T, cum ar fi psoriazisul (Immunol Today. 1998 Jan;19(1):37-44). DTH murin partajează multiple caracteristici cu psoriazisul, incluzând infiltratul imun, însoțind creșterea citokinelor inflamatorii, și hiperproliferarea cheratinocitelor. Mai mult, multe clase de agenți care sunt eficiente în tratarea psoriazisului în clinici sunt

de asemenea inhibitori eficienți ai răspunsului DTH la șoareci (Agents Actions. 1993 Jan;38(1-2):116-21).

În ziua 0 și 1, șoarecii Balb/c sunt sensibilizați cu o aplicare topică, pe abdomenul lor ras cu antigenul 2,4-dinitro-fluorobenzen (DNFB). În ziua 5, urechile sunt măsurate pentru grosime utilizând un micrometru pentru ingineri. Această măsurare este înregistrată și utilizată ca linie de bază. Ambele urechi ale animalelor sunt apoi provocate printr-o aplicare topică de DNFB într-un total de 20 μL (10 μL pe pavilionul intern și 10 μL pe pavilionul extern) la o concentrație de 0,2%. După douăzeci și patru până la șaptezeci și două de ore după provocare, urechile sunt măsurate din nou. Tratamentul cu compușii testați este dat prin fazele de sensibilizare și provocare (ziua -1 până în ziua 7) sau înainte de, și prin faza de provocare (uzual în după amiezele zilelor 4 până în ziua 7). Tratamentul compușilor de test (în diferite concentrații) este administrat fie sistemic sau fie topic (aplicare topică a tratamentului la urechi). Eficacitățile compușilor de test sunt indicate de o reducere în umflarea urechilor în comparație cu situația fără tratament. Compușii care determină o reducere de 20% sau mai mult au fost considerați eficienți. În unele experimente, șoarecii sunt provocați dar nu sensibilizați (control negativ).

Efectul inhibitiv (inhibarea activării căilor JAK-STAT) al compușilor de test poate fi confirmat prin analiză imunohistochimică. Activarea căii JAK-STAT conduce la formarea și translocarea factorilor de transcripție funcționali. În plus, influxul de celule imune și proliferarea crescută a cheratinocitelor ar trebui de asemenea să furnizeze modificări unice ale profilului de expresie în ureche care pot fi investigate și cuantificate. Secțiunile de ureche înglobate în parafină și fixate cu formol (recoltate după faza de provocare în modelul DTH) sunt supuse la analiză imunohistochimică utilizând un anticorp care interacționează specific cu STAT3 fosforilată (clona 58E12, Cell Signaling Technologies). Urechile șoarecilor sunt tratate cu compuși de test, vehicul, sau dexametazonă (un tratament eficient clinic pentru psoriazis), sau fără nici un tratament, în modelul DTH, pentru comparații. Compușii de test și dexametazona pot produce modificări transcripționale similare atât calitative cât și cantitative, și ambii, compușii de test și dexametazona pot reduce numărul de celule care se infiltrează. Atât administrarea sistemică cât și cea topică a compușilor de test pot produce efecte inhibitive, adică, reducerea numărului de celule care se infiltrează și inhibarea modificărilor transcripționale.

#### **Exemplul E: Activitate anti-inflamatorie *in vivo***

Compușii de aici pot fi evaluați în modele pe rozătoare sau pe non-rozătoare concepute pentru a replica un răspuns inflamator singur sau complex. De exemplu, modelele de artrită pe rozătoare pot fi utilizate pentru a evalua potențialul terapeutic al compușilor dozați preventiv sau terapeutic. Aceste modele includ dar nu sunt limitate la, artrita indusă de colagen de șoarece sau șobolan, artrita indusă de adjuvant de șobolan, și artrita indusă de anticorp de colagen. Bolile autoimune incluzând, dar fără a se limita la, scleroză multiplă, diabet zaharat de tip I, uveoretinită, tiroidită, miastenia gravis, nefropatii imunoglobulinice, miocardită, sensibilizarea căilor aeriene (astm), lupus, sau colită pot fi de asemenea utilizate pentru a evalua potențialul terapeutic al compușilor de aici. Aceste modele sunt bine stabilite în comunitatea de cercetare și sunt familiare celor calificați în domeniu (Current Protocols in Immunology, Vol 3., Coligan, J.E. și colab, Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. și Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

#### **Exemplul F: Modelele pe animale pentru tratamentul ochiului uscat, uveită, și conjunctivită**

Agentii pot fi evaluați în unul sau mai multe modele preclinice ale ochiului uscat cunoscute celor specializați în domeniu incluzând, dar fără a se limita la, modelul glandei lacrimale concavaline A (ConA) de iepure, modelul cu scopolamină la șoarece (subcutanat sau transdermal), modelul glandei lacrimale Botulinum la șoarece, sau oricare dintr-un număr de modele auto-imune spontan pe rozătoare care conduce la disfuncția glandei oculare (de exemplu NOD-SCID, MRL/lpr, sau NZB/NZW) (Barabino și colab., Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 și Schrader și colab., Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312). Obiectivele finale în aceste modele pot include histopatologia glandelor oculare și ochilor (cornea, etc.) și posibil testul Schirmer clasic sau versiuni modificate ale acestuia (Barabino și colab.) care măsoară producția de lacrimi. Activitatea poate fi evaluată prin dozarea pe multiple căi de administrare (de exemplu sistemic sau topic) care poate începe înainte sau după ce există boala măsurabilă.

Agentii pot fi evaluați în unul sau mai multe modele preclinice de uveită cunoscute celor specializați în domeniu. Acestea includ, dar nu se limitează la, modele de uveită autoimună experimentală (EAU) și uveită indusă de endotoxină (EIU). Experimentele EAU pot fi efectuate pe iepure, șobolan, sau șoarece și pot implica imunizarea pasivă sau activată. De exemplu, oricare dintr-un număr sau antigeni retinali pot fi utilizați pentru a sensibiliza animalele la un imunogen relevant după care animalele poate fi provocate ocular cu același antigen. Modelul EIU este mai acut și implică administrarea locală sau sistemică de lipopolizaharide la doze subletale. Obiectivele finale pentru ambele modele EIU și EAU pot include examenul fundoscopic, și histopatologia printre altele. Aceste modele sunt analizat de Smith și colab. (Immunology și Cell Biology 1998, 76, 497-512). Activitatea

este evaluată prin dozarea prin multiple căi de administrare (de exemplu sistemică sau topică) care pot începe înainte de, sau după ce boala măsurabilă există. Unele modele listate mai sus pot dezvolta de asemenea sclerită/episclerită, coriodită, ciclită, sau irită și sunt prin urmare utile în investigarea potențialei activități a compușilor pentru tratamentul terapeutic al acestor boli.

5 Agenții pot fi de asemenea evaluați în unul sau mai multe modele preclinice de conjunctivită cunoscute celor calificați în domeniu. Acestea includ, dar nu sunt limitate la, modele pe rozătoare care utilizează cobai, șobolani, sau șoareci. Modelele pe cobai le include pe cele care utilizează imunizarea activă sau pasivă și/sau protocoalele de provocare imune cu antigeni cum ar fi ovalbumină sau ambrozie (analizate în Groneberg, D.A., și colab., *Allergy* 2003, 58, 1101-1113). Modelele pe șobolani și șoareci  
10 sunt similare în conceperea generală cu cele pe cobai (analizate de asemenea de Groneberg). Activitatea poate fi evaluată prin dozarea prin multiple căi de administrare (de exemplu sistemică sau topică) care poate începe înainte de, sau după ce boala măsurabilă există. Obiectivele finale pentru astfel de studii pot include, de exemplu, analiza histologică, imunologică, biochimică, sau moleculară a țesuturilor oculare cum ar fi conjunctiva.

15 **Exemplul G: Protecția osului *in vivo***

Compușii pot fi evaluați în diferite modele preclinice de osteopenie, osteoporoză, sau resorpție osoasă cunoscute celor specializați în domeniu. De exemplu, rozătoarele ovarictomizate pot fi utilizate pentru a evalua abilitatea compușilor de a afecta semne și markeri ale remodelării și/sau densității osoase (W.S.S. Jee și W. Yao, *J Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207). Alternativ,  
20 densitatea și arhitectura osoasă pot fi evaluate la rozătoarele tratate cu control sau compus în modelele de osteopenie indusă de terapie (de exemplu glucocorticoid) (Yao, și colab. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; și *id.* 58(11), 1674-1686). În plus, efectele compușilor asupra resorpției și densității osoase pot fi evaluabile pe modelele de rozătoare ale artritei discutate mai sus (Exemplu E). Obiectivele finale pentru toate aceste modele pot varia dar adesea includ evaluări histologice și  
25 radiologice precum și imunohistologice și markeri biochimici adecvați ai remodelării osoase.

A fost descris un număr de realizări ale invenției. Totuși, se va înțelege că pot fi făcute diferite modificări fără îndepărtarea de domeniul invenției. Corespunzător, alte realizări sunt în domeniul următoarelor revendicări.

#### (56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- 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
- WO-A1-97/24324
- WO-A1-2011/112662
- WO-A1-2013/036611
- WO-A1-2014/138168

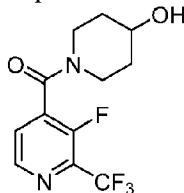
**(57) Revendicări:**

1. Un procedeu, cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:



III

sau a unei săruri a acestuia, cu 4-hidroxipiperidină pentru a forma un compus cu Formula IV:



IV

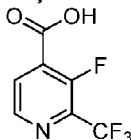
sau o sare a acestuia.

2. Procedeu conform revendicării 1, în care punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidină este efectuată în prezența unei baze.

3. Procedeu conform revendicării 2, în care baza este o amină terțiară, în care opțional amina terțiară este *N,N*-diizopropiletilamină.

4. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidină este efectuată într-o componentă solvent care cuprinde diclorometan, în care opțional punerea în reacție cu 4-hidroxipiperidină este efectuată la o temperatură de la aproximativ 25°C până la aproximativ 35°C.

5. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care compusul cu Formula III este format printr-un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula II:



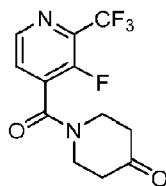
II

sau a unei săruri a acestuia, cu clorură de oxalil pentru a forma compusul cu Formula III, sau o sare a acestuia.

6. Procedeu conform revendicării 5, în care punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este:

- (a) efectuată în prezența unei cantități catalitice de dimetil formamidă (DMF; și/sau
- (b) efectuată într-o componentă solvent cuprinzând diclorometan; și/sau
- (c) efectuată la o temperatură de la aproximativ 15°C până la aproximativ 25°C.

7. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 1-6, cuprinzând în plus punerea în reacție a unui compus cu Formula IV, sau a unei săruri a acestuia, sub condiții de oxidare pentru a forma un compus cu Formula V:



V

sau o sare a acestuia.

8. Procedeu conform revendicării 7, în care condițiile de oxidare cuprind un prim agent de oxidare, în care opțional, condițiile de oxidare cuprind un al doilea agent de oxidare.

9. Procedeu conform revendicării 8, în care:

(a) primul agent de oxidare este acidul tricloroizocianuric (TCIC), în care opțional, TCIC este prezent între aproximativ 0,5 și aproximativ 0,7 echivalenți molar față de compusul cu Formula IV; și/sau

(b) al doilea agent de oxidare este 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO), în care opțional TEMPO este prezent între aproximativ 0,015 și aproximativ 0,025 echivalenți molar față de compusul cu Formula IV.

10. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 7-9, în care punerea în reacție a unui compus cu Formula IV sub condiții de oxidare cuprinde în plus:

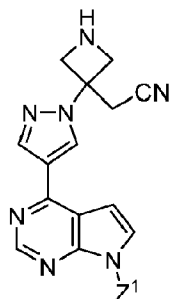
(a) unul sau mai mulți dintre bicarbonat de sodiu, carbonat de sodiu, și bromură de sodiu; și/sau

(b) o componentă solvent cuprinzând diclorometan, în care opțional componenta solvent cuprinde în plus apă.

11. Procedeu conform revendicării 7, în care condițiile de oxidare cuprind adăugarea de acid tricloroizocianuric la o soluție cuprinzând compusul cu Formula IV și TEMPO la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C; în care opțional adăugarea de acid tricloroizocianuric cuprinde adăugarea acidului tricloroizocianuric în cel puțin două porții.

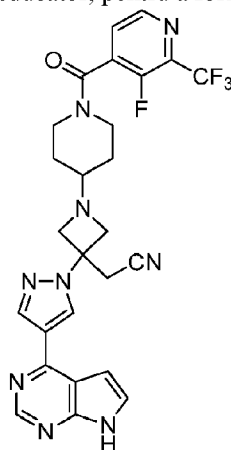
12. Procedeu conform revendicării 11, în care soluția este agitată după respectiva adăugare la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C timp de aproximativ 30 min, opțional cuprinzând în plus, după respectiva agitare, încălzirea respectivei soluții până la o temperatură de la aproximativ 20°C până la aproximativ 25°C timp de aproximativ o oră până la aproximativ două ore.

13. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 7-12, cuprinzând în plus punerea în reacție a unui compus cu Formula V cu un compus cu Formula VI:



VI

sau o sare a acestuia, în prezența unui agent reducător, pentru a forma un compus cu Formula I:



I

sau o sare a acestuia;

în care  $Z^1$  este H sau o grupare de protecție, în special în care  $Z^1$  este H.

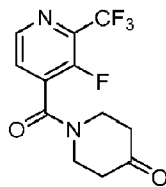
14. Procedeu conform revendicării 13, în care agentul reducător este cianoborohidruură de sodiu sau triacetoxiborohidruură de sodiu.

15. Un procedeu, cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula III:



III

sau a unei săruri a acestuia, cu 4-piperidonă, sau cu o sare a acesteia, pentru a forma un compus cu Formula V:



V

sau o sare a acestuia.

16. Procedeu conform revendicării 15, în care 4-piperidona, sau o sare a acesteia, este:

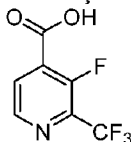
- (a) clorhidrat de 4-piperidonă; sau
- (b) monohidrat clorhidrat de 4-piperidonă.

17. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 15-16, în care punerea în reacție cuprinde în plus o bază, în care opțional baza este carbonat de sodiu.

18. Procedeu din oricare dintre revendicările 15-17, în care punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona este:

- (a) efectuată într-o componentă solvent cuprinzând diclorometan; și/sau
- (b) efectuată la o temperatură de la aproximativ 0°C până la aproximativ 5°C.

19. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 15-18, în care compusul cu Formula III este format printr-un procedeu cuprinzând punerea în reacție a unui compus cu Formula II:



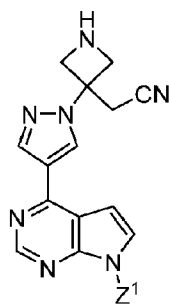
II

sau a unei săruri a acestuia, cu clorură de oxalil pentru a forma compusul cu Formula III, sau o sare a acestuia.

20. Procedeu conform revendicării 19, în care:

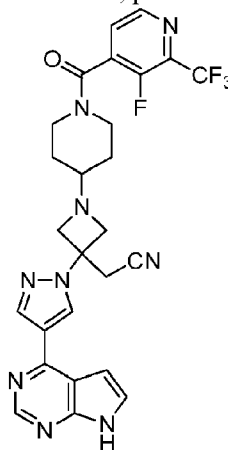
- (a) punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată în prezența unei cantități catalitice de dimetil formamidă (DMF); și/sau
- (b) punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată într-o componentă solvent cuprinzând diclorometan; și/sau
- (c) punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil este efectuată la o temperatură de la aproximativ 15°C până la aproximativ 25°C; și/sau
- (d) compusul cu Formula III nu este izolat înainte de punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona; și/sau
- (e) punerea în reacție a unui compus cu Formula II cu clorura de oxalil și punerea în reacție a unui compus cu Formula III cu 4-piperidona sunt efectuate într-un singur reactor.

21. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările 16-20, cuprinzând în plus punerea în reacție a unui compus cu Formula V cu un compus cu Formula VI:



VI

sau cu o sare a acestuia, în prezența unui agent reducător, pentru a forma un compus cu Formula I:



I

sau o sare a acestuia;

în care  $Z^1$  este H sau o grupare de protecție, în special în care  $Z^1$  este H.

22. Procedul conform revendicării 21, în care agentul reducător este cianoborohidruță de sodiu sau triacetoxiborohidruță de sodiu.