



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201317246 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101132595

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C07F7/10 (2006.01)

C07D487/04 (2006.01)

C07D401/06 (2006.01)

C07D491/113(2006.01)

(30)優先權：2011/09/07

美國

61/531,896

(71)申請人：英塞特公司 (美國) INCYTE CORPORATION

(US)

美國

(72)發明人：周家謙 ZHOU, JIACHENG (US)；吳永忠 WU, YONGZHONG (CN)；劉平里 LIU, PINGLI (CN)；曹敢峰 CAO, GANFENG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：0 共 72 頁

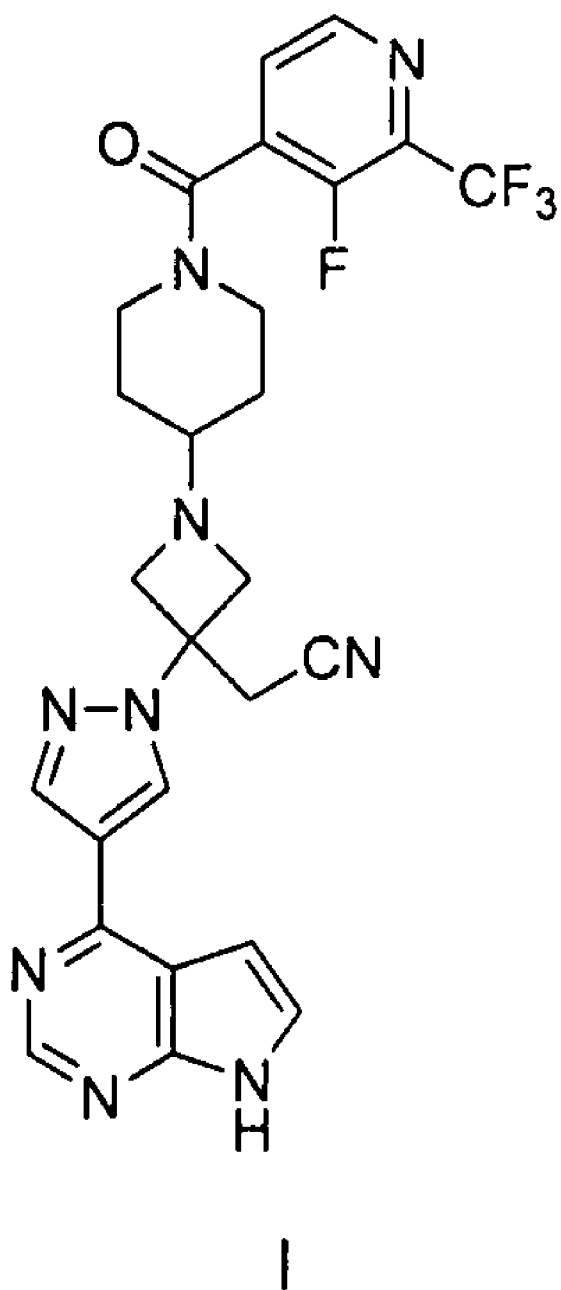
(54)名稱

用於製備 J A K 抑制劑之方法及中間物

PROCESSES AND INTERMEDIATES FOR MAKING A JAK INHIBITOR

(57)摘要

本發明係關於用於製備適用於治療與詹納斯激酶(JAK)之活性相關之疾病，包括發炎性病症、自體免疫性病症、癌症及其他疾病的{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈之方法及中間物。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201317246 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101132595

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 06 日

(51)Int. Cl.：

C07F7/10 (2006.01)

C07D487/04 (2006.01)

C07D401/06 (2006.01)

C07D491/113(2006.01)

(30)優先權：2011/09/07

美國

61/531,896

(71)申請人：英塞特公司 (美國) INCYTE CORPORATION

(US)

美國

(72)發明人：周家謙 ZHOU, JIACHENG (US)；吳永忠 WU, YONGZHONG (CN)；劉平里 LIU, PINGLI (CN)；曹敢峰 CAO, GANFENG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：0 共 72 頁

(54)名稱

用於製備 J A K 抑制劑之方法及中間物

PROCESSES AND INTERMEDIATES FOR MAKING A JAK INHIBITOR

(57)摘要

本發明係關於用於製備適用於治療與詹納斯激酶(JAK)之活性相關之疾病，包括發炎性病症、自體免疫性病症、癌症及其他疾病的{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈之方法及中間物。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫；惟已有申請案號者請填寫)

※ 申請案號：101132595

※ 申請日期：101. 9. 6

※IPC 分類：C07F7/10 (2006.01)
C07D487/04 (2006.01)
C07D401/06 (2006.01)
C07D491/13 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於製備 JAK 抑制劑之方法及中間物/PROCESSES AND INTERMEDIATES FOR MAKING A JAK INHIBITOR

二、中文發明摘要：

本發明係關於用於製備適用於治療與詹納斯激酶(JAK)之活性相關之疾病，包括發炎性病徵、自體免疫性病徵、癌症及其他疾病的{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈之方法及中間物。

三、英文發明摘要：

This invention relates to processes and intermediates for making {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluoromethyl)isonicotinoyl]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.

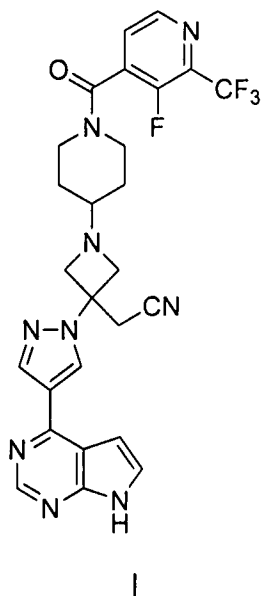
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖爲：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

本申請案主張 2011 年 9 月 7 日申請之美國臨時申請案 61/531,896 之優先權益，該臨時申請案以全文引用的方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於製備適用於治療與詹納斯激酶(JAK)之活性相關之疾病，包括發炎性病徵、自體免疫性病徵、癌症及其他疾病的{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈之方法及中間物。

【先前技術】

蛋白質激酶(PK)調控不同生物過程，尤其包括細胞生長、存活、分化、器官形成、形態發生、新血管生成、組織修復及再生。蛋白質激酶亦在許多人類疾病(包括癌症)中起特別作用。細胞激素、低分子量多肽或醣蛋白調控宿主對敗血症之發炎性反應中涉及之許多路徑。細胞激素影響細胞分化、增殖及活化，且可調節促發炎反應與消炎反應兩者以使宿主可對病原體起適當反應。廣泛範圍之細胞激素之信號傳導涉及蛋白質酪胺酸激酶之詹納斯激酶家族(JAK)及轉錄之信號轉導因子及活化因子(Signal Transducers and Activators of Transcription; STAT)。存在四種已知哺乳動物 JAK: JAK1(詹納斯激酶-1)、JAK2、JAK3(亦稱為白血球詹納斯激酶; JAKL; 及 L-JAK)

及 TYK2(蛋白質-酪胺酸激酶 2)。

細胞激素刺激之免疫及發炎性反應有助於疾病之發病機制：諸如嚴重合併性免疫缺失(SCID)之病理學起因於免疫系統受遏制，而活性過高或不當之免疫/發炎性反應有助於自體免疫性疾病(例如哮喘、全身性紅斑狼瘡(systemic lupus erythematosus)、甲狀腺炎、心肌炎)及諸如硬皮病及骨關節炎之疾病之病理學(Ortmann, R. A., T. Cheng 等人 (2000) *Arthritis Res* 2(1): 16-32)。

JAK 之表現不足與許多疾病病況相關。舉例而言，*Jak1*^{-/-}小鼠在出生時矮小、無法照料且在週產期死亡(Rodig, S. J., M. A. Meraz 等人 (1998) *Cell* 93(3): 373-83)。*Jak2*^{-/-}小鼠胚胎貧血且由於不存在決定性之紅血球生成而在交配後約第 12.5 天死亡。

咸信 JAK/STAT 路徑且特定言之所有四種 JAK 在哮喘反應、慢性阻塞性肺病、支氣管炎及下呼吸道之其他相關發炎性疾病之發病機制中起作用。已發現經由 JAK 傳導信號之多種細胞激素與上呼吸道之發炎性疾病/病狀，諸如影響鼻及竇者(例如鼻炎及竇炎)相關聯，無論其是否為典型過敏性反應。亦已發現 JAK/STAT 路徑牽涉於眼部之發炎性疾病/病狀及慢性過敏性反應中。

癌症中 JAK/STAT 之活化可由於細胞激素刺激(例如 IL-6 或 GM-CSF)或內源性 JAK 信號傳導抑制因子，諸如 SOCS(細胞激素信號傳導之抑制因子)或 PIAS(活化 STAT 之蛋白質抑制因子)之減少而發生(Boudny, V.及 Kovarik,

J., *Neoplasms*. 49:349-355, 2002)。STAT 信號傳導以及 JAK 下游之其他路徑(例如 Akt)之活化已與許多癌症類型中之不良預後相關聯(Bowman, T. 等人 *Oncogene* 19:2474-2488, 2000)。經由 JAK/STAT 傳導信號之循環細胞激素之含量升高在惡病質(cachexia)及/或慢性疲勞中起病因性作用。因此, JAK 抑制可能因延及潛在抗腫瘤活性以外之原因而有益於癌症患者。

JAK2 酪胺酸激酶可有益於患有骨髓增生性病變, 例如真性紅細胞增多症(polycythemia vera, PV)、原發性血小板增多症(essential thrombocythemia, ET)、伴有骨髓纖維化之骨髓化生(myeloid metaplasia with myelofibrosis, MMM)之患者(Levin 等人, *Cancer Cell*, 第 7 卷, 2005: 387-397)。抑制 JAK2V617F 激酶會減少造血細胞之增殖, 表明 JAK2 為用於在患有 PV、ET 及 MMM 之患者中進行藥理學抑制之潛在目標。

抑制 JAK 可能有益於罹患皮膚免疫病症, 諸如牛皮癬及皮膚敏化之患者。咸信除各種趨化因子及生長因子之外, 牛皮癬之維持亦取決於許多發炎性細胞激素(JCI, 113:1664-1675), 其中許多發炎性細胞激素經由 JAK 傳導信號(*Adv Pharmacol.* 2000;47:113-74)。

JAK1 在當調控異常時可導致或促成疾病病況之許多細胞激素及生長因子信號傳導路徑中起主要作用。舉例而言, 在類風濕性關節炎(一種已表明具有不利影響之疾病)中, IL-6 含量升高(Fonesca, J.E. 等人, *Autoimmunity*

Reviews, 8:538-42, 2009)。因爲 IL-6 至少部分經由 JAK1 傳導信號，所以預期經由 JAK1 抑制直接或間接拮抗 IL-6 會提供臨床益處 (Guschin, D., N.等人 Embo J 14:1421, 1995；Smolen, J. S.等人 Lancet 371:987, 2008)。此外，在一些癌症中，JAK1 突變，從而導致不合需要之組成性腫瘤細胞生長及存活 (Mullighan CG, Proc Natl Acad Sci U S A.106:9414-8, 2009；Flex E.等人 J Exp Med. 205:751-8, 2008)。在其他自體免疫性疾病及癌症中，活化 JAK1 之發炎性細胞激素之全身性含量升高亦可促成疾病及/或相關症狀。因此，患有此等疾病之患者可受益於 JAK1 抑制。JAK1 之選擇性抑制劑可爲有效的，同時避免抑制其他 JAK 激酶之不必要及可能不合需要的效應。

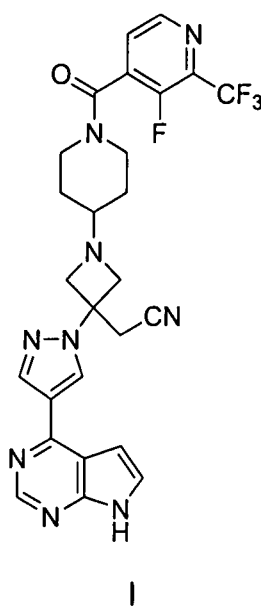
相對於其他 JAK 激酶對 JAK1 具有選擇性之抑制劑可具有優於選擇性較低之抑制劑的多種治療優勢。關於針對 JAK2 之選擇性，許多重要細胞激素及生長因子經由 JAK2 傳導信號，包括例如紅血球生成素(erythropoietin, Epo) 及血小板生成素(thrombopoietin, Tpo)(Parganas E 等人 Cell. 93:385-95, 1998)。Epo 爲紅血球產生之關鍵生長因子；因此缺乏 Epo 依賴性信號傳導可導致紅血球數量減少及貧血 (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006)。作爲 JAK2 依賴性生長因子之另一實例，Tpo 在控制巨核細胞-亦即自其產生血小板之細胞的增殖及成熟中起主要作用 (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006)。因此，Tpo 信號傳導降低將使巨核細胞數減少 (巨核細胞減少症

(megakaryocytopenia))及循環血小板計數降低(血小板減少症(thrombocytopenia))。此可導致不合需要及/或不可控制之出血。對諸如 JAK3 及 Tyk2 之其他 JAK 之抑制降低亦可能合乎需要，因為缺乏此等激酶之功能性型式之人類已顯示罹患眾多疾病，諸如嚴重合併性免疫缺失或高免疫球蛋白 E 症候群(Minegishi, Y 等人 Immunity 25:745-55, 2006 ;Macchi P 等人 Nature. 377:65-8, 1995)。因此，就涉及免疫遏制、貧血及血小板減少症之副作用減少而言，對其他 JAK 之親和力降低之 JAK1 抑制劑將具有優於選擇性較低之抑制劑的顯著優勢。

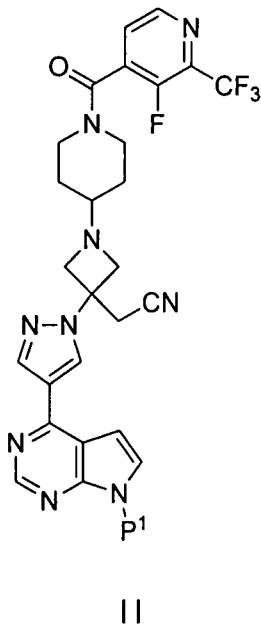
歸因於 JAK 抑制劑之適用性，需要開發用於製備 JAK 抑制劑之新穎方法。本發明係針對此需要及其他需要。

【發明內容】

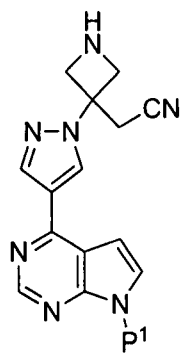
JAK 抑制劑描述於 2011 年 3 月 9 日申請之美國第 13/043,986 號(其以全文引用的方式併入本文中)中，包括 {1-{1-[3- 氟 -2-(三 氟 甲 基) 異 菸 鹼 醯 基] 哌 啶 -4- 基 }-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈，其在下文描述為式 I。



本發明尤其提供用於製備式 I 化合物之方法及中間物。
特定言之，本發明提供製備式 II 化合物：

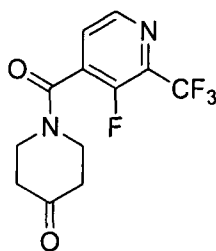


或其鹽之方法，其包含使式 III 化合物：



III

或其鹽與式 IV 化合物：

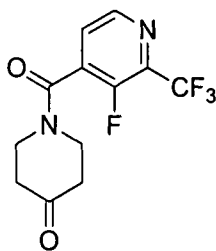


IV

或其鹽在還原劑存在下反應以形成該式 II 化合物或其該鹽，其限制條件為該還原劑不為氰基硼氫化鈉；

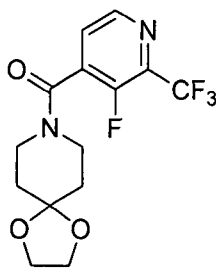
其中 P^1 為保護基。

本發明亦提供製備式 IV 化合物：



IV

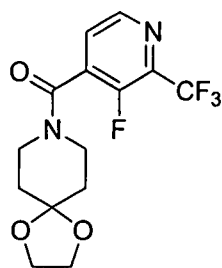
或其鹽之方法，其包含使式 V 化合物：



V

或其鹽脫保護以形成式 IV 化合物或其該鹽。

本發明提供製備式 V 化合物：



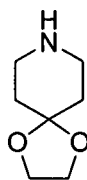
V

或其鹽之方法，其包含使式 VI 化合物：



VI

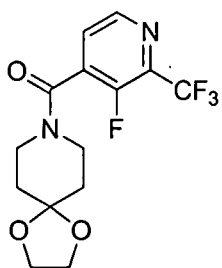
或其鹽與式 VII 化合物：



VII

在偶合劑存在下反應以形成該式 V 化合物或其該鹽。

本發明更提供式 V 化合物：

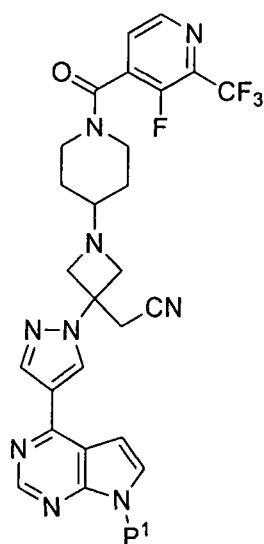


V

或其鹽。

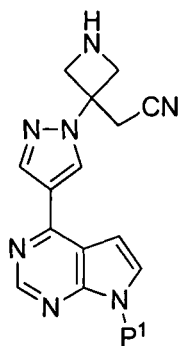
【實施方式】

本發明提供一種製備式 II 化合物：



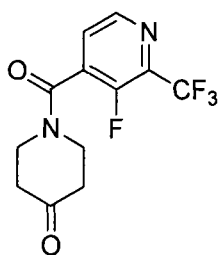
II

或其鹽之方法，其包含使式 III 化合物：



III

或其鹽與式 IV 化合物：



IV

或其鹽在還原劑存在下反應以形成該式 II 化合物或其該鹽，其限制條件為該還原劑不為氰基硼氫化鈉；其中 P¹ 為保護基。

在一些實施例中，式 III 及式 IV 化合物較佳以游離鹼形式使用且式 II 化合物較佳以游離鹼形式產生。如本文所用，「游離鹼」意謂化合物之非鹽形式。

在一些實施例中，在三級胺(例如三乙胺)存在下進行化合物 III 與化合物 IV 之反應。在一些實施例中，反應溫度 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 。在一些實施例中，反應在適合溶劑中進行。在一些實施例中，適合溶劑為二氯甲烷。

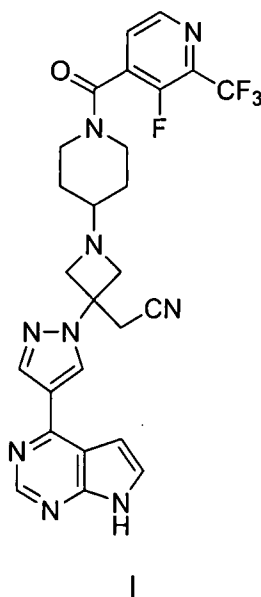
適當 P^1 保護基包括(但不限於)Wuts 及 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley & Sons: New Jersey, 第 696-887 頁(且特定言之第 872-887 頁)(2007)中描述之胺保護基,該文獻以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中， P^1 為苯甲氧基羰基(Cbz)、2,2,2-三氯乙氧基羰基(Troc)、2-(三甲基矽烷基)乙氧基羰基(Teoc)、2-(4-三氟甲基苯磺醯基)乙氧基羰基(Tsc)、第三丁氧基羰基(BOC)、1-金剛烷基氧基羰基(Adoc)、2-金剛烷基羰基(2-Adoc)、2,4-二甲基戊-3-基氧基羰基(Doc)、環己基氧基羰基(Hoc)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙氧基羰基(TcBOC)、乙烯基、2-氯乙基、2-苯磺醯基乙基、烯丙基、苯甲基、2-硝基苯甲基、4-硝基苯甲基、二苯基-4-吡啶基甲基、 N',N' -二甲基胥基、甲氧基甲基、第三丁氧基甲基(Bum)、苯甲氧基甲基(BOM)、2-四氫吡喃基(THP)、三(C_{1-4} 烷基)矽烷基(例如三(異丙基)矽烷基)、1,1-二乙氧基甲基、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ (SEM)或 N -特戊醯基氧基甲基(POM)。在一些實施例中， P^1 為

-CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃。

還原劑可為適合在還原性胺化中使用之任何還原劑，包括各種硼氫化物及硼烷還原劑，諸如 Ellen W. Baxter 及 Allen B. Reitz, *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents, Organic Reactions*, 第 1 章，第 1-57 頁(Wiley, 2002)中之還原劑，該文獻以全文引用的方式併入本文中。適當還原劑之非限制性類別包括硼氫化物、氰基硼氫化物、三(C₁₋₄ 醯基)氧基硼氫化物(例如三乙醯氧基硼氫化物衍生物)、9-硼雜雙環[3.3.1]壬烷氫化物、三(C₁₋₄ 烷基)硼氫化物及二異松蒎基氰基硼氫化物衍生物、胺基硼烷、硼烷-吡啶錯合物及烷基胺硼烷。適當還原劑之非限制性實例包括氰基硼氫化物鈉、三乙醯氧基硼氫化鈉、氰基-9-硼雜雙環[3.3.1]壬烷氫化鈉、氰基硼氫化四丁銨、於固體支撐物上之氰基硼氫化物、三乙醯氧基硼氫化四甲銨、三乙醯氧基硼氫化鈉、三乙基硼氫化鋰、三(第二丁基)硼氫化鋰、二異松蒎基氰基硼氫化鈉、兒茶酚硼烷、硼烷四氫呋喃、硼氫化鈉、硼氫化鉀、硼氫化鋰、在氫氣存在下之鈹、5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)、2-甲基吡啶硼烷或聚合物支撐之三乙醯氧基硼氫化物。在一些實施例中，任何以上提及者且較佳氰基硼氫化鈉與鈦(IV)添加劑、脫水劑或鹵化鋅添加劑組合使用。在一些實施例中，還原劑為氰基硼氫化四(C₁₋₄ 烷基)銨或三乙醯氧基硼氫化四(C₁₋₄ 烷基)銨、鹼金屬氰基硼氫化物或鹼金屬三

乙醯氧基硼氫化物、或鹼土氰基硼氫化物或三乙醯氧基硼氫化物。在一些實施例中，還原劑為鹼金屬氰基硼氫化物。在一些實施例中，還原劑係選自氰基硼氫化鈉及三乙醯氧基硼氫化鈉。在一些實施例中，還原劑為三乙醯氧基硼氫化鈉。如本文所用，鈦(IV)添加劑為含有鈦(IV)金屬之路易斯酸(Lewis acid)(例如四氯化鈦、異丙醇鈦、乙醇鈦及其類似物)。

在一些實施例中，方法進一步包含使式 II 化合物或其該鹽脫保護以形成式 I 化合物：



或其鹽。

在一些實施例中，式 I 化合物最初以游離鹼形式自式 II 化合物之游離鹼形式產生。

在一些實施例中，脫保護涉及使式 II 化合物與適合脫保護劑反應。在一些實施例中，脫保護包含用乙醚合三氟化硼處理，隨後用氫氧化銨水溶液處理。在一些實施例中，在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 或 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 之溫度下，在適

合溶劑中進行脫保護。在一些實施例中，適合溶劑為乙腈。

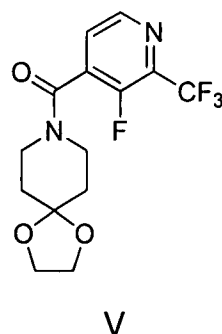
在一些實施例中，脫除式 II 化合物之保護基以形成式 I 化合物之方法進一步包含使式 I 化合物與己二酸反應以形成己二酸鹽。

在一些實施例中，方法進一步包含：

- (a) 在回流下在甲醇中加熱式 I 化合物以形成混合物；
- (b) 在(a)之後，向該混合物中添加甲基異丁基酮；
- (c) 在(b)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；
- (d) 在(c)之後，向該濃縮混合物中添加甲醇以形成稀釋混合物；
- (e) 在(d)之後，在回流下加熱該稀釋混合物以形成混合物；
- (f) 在(e)之後，向該混合物中添加甲基異丁基酮；
- (g) 在(f)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；
- (h) 在(g)之後，向該濃縮混合物中添加己二酸及甲醇；
- (i) 在(h)之後，在回流下加熱該混合物；及
- (j) 在(i)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；
- (k) 在(j)之後，向該混合物中添加庚烷；及
- (l) 在(k)之後，在室溫下攪拌該混合物以形成該式 I 化合物之己二酸鹽。

處理式 II 化合物以移除 P^1 基團可藉由此項技術中已知用於移除特定胺保護基之方法達成，該等方法諸如 Wuts 及 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley & Sons: New Jersey, 第 696-887 頁(且特定言之第 872-887 頁)(2007)中之方法，該文獻以全文引用的方式併入本文中。舉例而言，在一些實施例中，藉由用氟化物離子(例如用氟化四丁銨處理)、鹽酸、對甲苯磺酸吡錠(PPTS)或路易斯酸(例如四氟硼酸鋰)處理來移除 P^1 基團。在一些實施例中，處理包含用四氟硼酸鋰處理，隨後用氫氧化銨處理(例如當 P^1 為 2-(三甲基矽烷基)乙氧基甲基時)。在一些實施例中，處理包含用鹼處理(例如 P^1 為 N-特戊醯基氧基甲基)。在一些實施例中，鹼為鹼金屬氫氧化物。在一些實施例中，鹼為氫氧化鈉。在一些實施例中，處理包含用氫氧化鈉或氨在諸如甲醇或水之溶劑中處理。

在一些實施例中，式 IV 化合物或其鹽係藉由包含使式 V 化合物：



或其鹽脫保護之方法產生。

在一些實施例中，式 V 化合物較佳以游離鹼形式使用

且式 IV 化合物較佳以游離鹼形式產生。

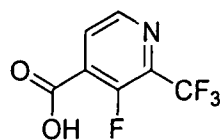
在一些實施例中，脫保護包含與酸水溶液反應。

在一些實施例中，酸為鹽酸。

在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 5、6、7、8、9 或 10 當量之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 6、7、8、9 或 10 當量或 10 當量以上之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 7、8、9 或 10 當量或 10 當量以上之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 8、9 或 10 當量或 10 當量以上之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 9 或 10 當量或 10 當量以上之酸水溶液。在一些實施例中，使用相對於式 V 化合物過量 9 當量或 9 當量以上之酸水溶液。在一些實施例中，在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 或 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 之溫度下，在乙腈溶劑中進行脫保護。

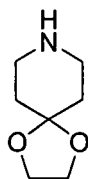
其他適當脫保護條件包括(但不限於)Wuts 及 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley & Sons: New Jersey, 第 696-887 頁(且特定言之第 872-887 頁)(2007)中之條件，該文獻以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，式 V 化合物係藉由包含使式 VI 化合物：



VI

或其鹽與式 VII 化合物：



VII

或其鹽在偶合劑存在下反應之方法產生。

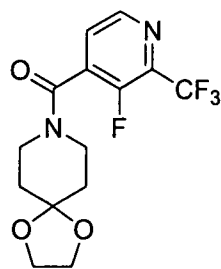
適當偶合劑為用於使胺與酸偶合以形成胺之任何熟知偶合劑。非限制性實例包括碳化二亞胺(例如 *N,N'*-二環己基碳化二亞胺(DCC)、*N,N'*-二異丙基碳化二亞胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基或二甲胺基丙基)-*N'*-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC 鹽酸鹽)或碳化二亞胺(EDC)或 1,1'-羰基二咪唑(CDI))、在 1-羥基苯并三唑(HOBt)或其水合物存在下之碳化二亞胺試劑、磷基偶合劑(例如六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(二甲胺基)-磷(BOP)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(*N*-吡咯啶基)磷(PyBOP)、六氟磷酸(7-氮雜苯并三唑-1-基氧基)-參-(*N*-吡咯啶基)磷(PyAOP)、六氟磷酸溴三(*N*-吡咯啶基)磷(PyBrOP)、氯化雙(2-側氧基-3-噁唑啶基)磷(BOP-Cl))、鉍基試劑(例如六氟磷酸 *O*-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲鎵(HBTU)、四氟硼酸 *O*-(苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲鎵(TBTU)、3-(二乙基磷醯基

氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT)、六氟磷酸 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎗(HATU)、六氟磷酸 O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎗(HCTU)及四氟硼酸 O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎗(TATU))、鎗基試劑(四氟硼酸 O-(5-降冰片烯-2,3-二甲醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲鎗(TNTU)及四氟硼酸 O-(N-丁二醯亞胺基)-1,1,3,3-四甲鎗(TSTU)、四氟硼酸 O-(3,4-二氫-4-側氧基-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲鎗(TDBTU)、四氟硼酸 O-(1,2-二氫-2-側氧基-1-吡啶基)-N,N,N',N'-四甲鎗(TPTU)或四氟硼酸 O-[(乙氧基羰基)氰基-亞甲基胺基]-N,N,N',N'-四甲鎗(TOTU))、其他試劑，包括(但不限於)3-(二乙基磷醯基氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT)、羰基二咪唑(CDI)、六氟磷酸 N,N,N',N'-四甲基氯甲脒(TCFH)或丙基膦酸酐溶液。在一些實施例中，偶合劑為六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(二甲胺基)-磷(BOP)。

在一些實施例中，式 V、式 VI 及式 VII 化合物較佳呈其非鹽形式。

在一些實施例中，在三級胺(例如三乙胺)存在下進行式 VI 化合物與式 VII 化合物之反應。在一些實施例中，在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 或 $\leq 15^{\circ}\text{C}$ 之溫度下，在二甲基甲醯胺(DMF)中進行反應。在一些實施例中，偶合劑相對於式 VI 化合物以 ≥ 1.05 、 ≥ 1.1 或 ≥ 1.2 當量存在。

本發明亦提供一種式 V 化合物：



V

或其鹽，其為上述方法中之適用中間物。

在一些實施例中，式 V 化合物為游離鹼。

本文所述之方法可根據此項技術中已知之任何適合方法加以監測。舉例而言，產物形成可藉由分光手段，諸如核磁共振光譜法(例如 ^1H 或 ^{13}C)、紅外光譜法或分光光度測定法(例如紫外-可見)；或藉由層析，諸如高效液相層析(HPLC)或薄層層析(TLC)；或其他相關技術進行監測。

如本文所用，術語「反應」係如此項技術中所已知加以使用且通常指以允許化學試劑在分子層面上相互作用以達成化學或物理轉化之方式使其集合。在一些實施例中，反應涉及兩種試劑，其中相對於第一試劑使用一或多個當量之第二試劑。本文所述之方法之反應步驟可持續一定時間且在適於製備所鑒別產物之條件下進行。

製備化合物可涉及各種化學基團之保護及脫保護。保護及脫保護之需要及適當保護基之選擇可由熟習此項技術者容易地確定。保護基之化學可見於例如 Greene 等人, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, Wiley & Sons, 2007 中，其以全文引用的方式併入本文中。為適應本文所述之保護基及形成及裂解方法所作之調整可在

必要時根據各種取代基來調整。

本文所述之方法之反應可在可易於由熟習有機合成技術者選擇之適合溶劑中進行。適合溶劑可實質上不與起始物質(反應物)、中間物或產物在進行反應之溫度(例如可在溶劑之冷凍溫度至溶劑之沸騰溫度之範圍內的溫度)下反應。指定反應可在一種溶劑或一種以上溶劑之混合物中進行。視特定反應步驟而定，可選擇適於特定反應步驟之溶劑。在一些實施例中，反應可在不存在溶劑下進行，諸如當至少一種試劑為液體或氣體時。

適合溶劑可包括鹵化溶劑，諸如四氯化碳、溴二氯甲烷、二溴氯甲烷、溴仿、氯仿、溴氯甲烷、二溴甲烷、氯丁烷、二氯甲烷、四氯乙烯、三氯乙烯、1,1,1-三氯乙烷、1,1,2-三氯乙烷、1,1-二氯乙烷、2-氯丙烷、 α,α,α -三氟甲苯、1,2-二氯乙烷、1,2-二溴乙烷、六氟苯、1,2,4-三氯苯、1,2-二氯苯、氯苯、氟苯、其混合物及其類似物。

適合醚溶劑包括：二甲氧基甲烷、四氫呋喃、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、呋喃、乙醚、乙二醇二甲醚、乙二醇二乙醚、二乙二醇二甲醚、二乙二醇二乙醚、三乙二醇二甲醚、苯甲醚、第三丁基甲基醚、其混合物及其類似物。

適合質子性溶劑可包括例如(且不限制)水、甲醇、乙醇、2-硝基乙醇、2-氟乙醇、2,2,2-三氟乙醇、乙二醇、1-丙醇、2-丙醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、異丁醇、第三丁醇、2-乙氧基乙醇、二乙二醇、1-戊醇、2-戊醇或3-戊醇、新戊醇、第三戊醇、二乙二醇單甲醚、二乙二

醇單乙醚、環己醇、苯甲醇、苯酚或甘油。

適合非質子性溶劑可包括例如(且不限制)四氫呋喃(THF)、N,N-二甲基甲醯胺(DMF)、N,N-二甲基乙醯胺(DMA)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氫-2(1H)-嘧啶酮(DMPU)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMI)、N-甲基吡咯啉酮(NMP)、甲醯胺、N-甲基乙醯胺、N-甲基甲醯胺、乙腈、二甲亞砷、丙腈、甲酸乙酯、乙酸甲酯、六氯丙酮、丙酮、乙基甲基酮、乙酸乙酯、環丁砜、N,N-二甲基丙醯胺、四甲基脲、硝基甲烷、硝基苯或六甲基磷醯胺。

適合烴溶劑包括苯、環己烷、戊烷、己烷、甲苯、環庚烷、甲基環己烷、庚烷、乙苯、間二甲苯、鄰二甲苯或對二甲苯、辛烷、二氫茚、壬烷或蔡。

本文所述之方法之反應可在可易於由熟練技術人員確定之適當溫度下進行。反應溫度將取決於例如試劑及溶劑(若存在)之熔點及沸點；反應之熱力學(例如劇烈放熱反應可能需要在低溫下進行)；及反應之動力學(例如高活化能障壁可能需要高溫)。「高溫」係指高於室溫(約 22 °C)之溫度。

本文所述之方法之反應可在空氣中或在惰性氛圍下進行。通常，含有實質上可與空氣反應之試劑或產物之反應可使用熟練技術人員熟知之空氣敏感性合成技術進行。

在一些實施例中，製備化合物可涉及添加酸或鹼以影響例如對所要反應之催化作用或諸如酸加成鹽之鹽形式

之形成。

例示性酸可為無機酸或有機酸。無機酸包括鹽酸、氫溴酸、硫酸、磷酸及硝酸。有機酸包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、苯甲酸、4-硝基苯甲酸、甲烷磺酸、對甲苯磺酸、苯磺酸、酒石酸、三氟乙酸、丙炔酸、丁酸、2-丁炔酸、乙烯基乙酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸及癸酸。

例示性鹼包括氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀、碳酸鋰、碳酸鈉及碳酸鉀。一些例示性強鹼包括(但不限於)氫氧化物、烷氧化物、金屬醯胺、金屬氫化物、金屬二烷基醯胺及芳基胺，其中：烷氧化物包括甲基、乙基及第三丁基氧化物之鋰鹽、鈉鹽及鉀鹽；金屬醯胺包括胺化鈉、胺化鉀及胺化鋰；金屬氫化物包括氫化鈉、氫化鉀及氫化鋰；且金屬二烷基醯胺包括經甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、三甲基矽烷基及環己基取代之醯胺之鈉鹽及鉀鹽。

中間物及產物亦可包括本文揭示之化合物之鹽。如本文所用，術語「鹽」係指藉由向本文揭示之化合物中添加可接受之酸或鹼所形成之鹽。在一些實施例中，鹽為醫藥學上可接受之鹽。如本文所用，片語「醫藥學上可接受」係指某一物質就毒理學觀點來看可為在醫藥應用中使用所接受且不會不利地與活性成分相互作用。醫藥學上可接受之鹽(包括單鹽及雙鹽)包括(但不限於)由諸如(但不限於)以下之有機酸及無機酸獲得之鹽：乙酸、乳

酸、檸檬酸、肉桂酸、酒石酸、丁二酸、反丁烯二酸、順丁烯二酸、丙二酸、杏仁酸、蘋果酸、草酸、丙酸、鹽酸、氫溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、乙醇酸、丙酮酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、甲苯磺酸、水楊酸、苯甲酸及類似已知之可接受酸。適合鹽之清單見於 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第 1418 頁及 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977)中, 其各自以全文引用的方式併入本文中。

在根據本文所述之方法製備化合物後, 可使用常用分離及純化操作, 諸如濃縮、過濾、萃取、固相萃取、再結晶、層析及其類似操作來分離所要產物。

在一些實施例中, 本發明化合物及其鹽實質上經分離。就「實質上經分離」而言, 其意謂化合物至少部分或實質上自其形成或偵測到時所處之環境分離。部分分離可包括例如本發明化合物增濃之組合物。實質上分離可包括含有至少約 50 重量%、至少約 60 重量%、至少約 70 重量%、至少約 80 重量%、至少約 90 重量%、至少約 95 重量%、至少約 97 重量%或至少約 99 重量%的本發明化合物或其鹽之組合物。分離化合物及其鹽之方法在此項技術中為常規的。

用途

式 I 化合物{1-{1-[3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基]哌啶-4-基}-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]}

氮雜環丁烷-3-基}乙腈爲 JAK(例如 JAK1、JAK2)之抑制劑。JAK 抑制劑適用於治療各種 JAK 相關性疾病或病症。JAK 相關性疾病之實例包括涉及免疫系統之疾病，包括例如器官移植排斥(例如同種異體移植物排斥及移植物抗宿主疾病)。JAK 相關性疾病之實例包括自體免疫性疾病，諸如多發性硬化症、類風濕性關節炎、青少年關節炎、牛皮癬性關節炎、第 1 型糖尿病、狼瘡、牛皮癬、發炎性腸病、潰瘍性結腸炎、克羅恩氏病(Crohn's disease)、重症肌無力、免疫球蛋白腎病變、心肌炎、自體免疫性甲狀腺病症、慢性阻塞性肺病(COPD)及其類似疾病。在一些實施例中，自體免疫性疾病爲自體免疫性大皰性皮膚病症，諸如尋常天皰瘡(pemphigus vulgaris, PV)或大皰性類天皰瘡(bullous pemphigoid, BP)。

JAK 相關性疾病之其他實例包括過敏性病狀，諸如哮喘、食物過敏、濕疹性皮炎、接觸性皮炎、異位性皮炎(異位性濕疹)及鼻炎。JAK 相關性疾病之其他實例包括病毒性疾病，諸如艾伯斯坦巴爾病毒(Epstein Barr Virus, EBV)、B 型肝炎、C 型肝炎、HIV、HTLV 1、水痘-帶狀皰疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)及人類乳頭狀瘤病毒(Human Papilloma Virus, HPV)。

JAK 相關性疾病之其他實例包括與軟骨轉換(cartilage turnover)相關之疾病，例如痛風性關節炎、敗血性或感染性關節炎、反應性關節炎、反射交感性營養不良(reflex sympathetic dystrophy)、痛性營養不良(algodystrophy)、

泰齊症候群(Tietze syndrome)、肋骨關節病變、地方性變形性骨關節炎(osteoarthritis deformans endemica)、姆塞萊尼病(Mseleni disease)、漢迪格度病(Handigodu disease)、由纖維肌痛引起之退化、全身性紅斑狼瘡、硬皮病或強直性脊柱炎。

JAK 相關性疾病之其他實例包括先天性軟骨畸形,包括遺傳性軟骨溶解(hereditary chondrolysis)、軟骨發育不全(chondrodysplasias)及假性軟骨發育不全(pseudochondrodysplasias)(例如小耳症(microtia)、無耳(enotia)及幹骺端軟骨發育不全(metaphyseal chondrodysplasia))。

JAK 相關性疾病或病狀之其他實例包括皮膚病症,諸如牛皮癬(例如尋常性牛皮癬(psoriasis vulgaris))、異位性皮炎、皮疹、皮膚刺激、皮膚敏化(例如接觸性皮炎或過敏性接觸性皮炎)。舉例而言,當局部施用時,包括一些醫藥劑之某些物質可引起皮膚敏化。在一些實施例中,共投與或依序投與至少一種本發明 JAK 抑制劑以及引起不當敏化之藥劑可有助於治療此不當敏化或皮炎。在一些實施例中,藉由局部投與至少一種本發明 JAK 抑制劑來治療皮膚病症。

JAK 相關性疾病或病狀之其他實例包括特徵在於以下之疾病或病狀:實體腫瘤(例如前列腺癌、腎癌、肝癌、胰臟癌、胃癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、甲狀腺癌、神經膠母細胞瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、卡斯爾

曼氏病(Castleman's disease)、子宮平滑肌肉瘤、黑素瘤(melanoma)等)、血液科癌症(例如淋巴瘤、白血病(諸如急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML))或多發性骨髓瘤)及皮膚癌(諸如皮膚 T 細胞淋巴瘤(CTCL)及皮膚 B 細胞淋巴瘤)。例示性 CTCL 包括塞紮萊症候群(Sezary syndrome)及蕁樣真菌病(mycosis fungoides)。JAK 相關性疾病或病狀之其他實例包括肺動脈高血壓。

JAK 相關性疾病或病狀之其他實例包括發炎相關性癌症。在一些實施例中，癌症與發炎性腸病相關。在一些實施例中，發炎性腸病為潰瘍性結腸炎。在一些實施例中，發炎性腸病為克羅恩氏病。在一些實施例中，發炎相關性癌症為結腸炎相關性癌症。在一些實施例中，發炎相關性癌症為結腸癌或結腸直腸癌。在一些實施例中，癌症為胃癌、胃腸類癌腫瘤、胃腸基質腫瘤(GIST)、腺癌、小腸癌或直腸癌。

JAK 相關性疾病可進一步包括特徵在於表現以下之疾病：JAK2 突變體，諸如在假激酶域中具有至少一個突變者(例如 JAK2V617F)；在假激酶域以外具有至少一個突變之 JAK2 突變體；JAK1 突變體；JAK3 突變體；紅血球生成素受體(EPOR)突變體；或 CRLF2 之表現失調。

JAK 相關性疾病可進一步包括骨髓增生性病徵(MPD)，諸如真性紅細胞增多症(PV)、原發性血小板增多症(ET)、伴有骨髓化生之骨髓纖維化(MMM)、原發性骨髓纖維化(PMF)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓單核細胞性

白血病 (CMML)、嗜伊紅性白血球增多症候群 (hypereosinophilic syndrome, HES)、全身性肥大細胞病 (SMCD)及其類似疾病。在一些實施例中，骨髓增生性病變為骨髓纖維化(例如原發性骨髓纖維化(PMF)或真性紅細胞增多症/原發性血小板增多症後骨髓纖維化(PV 後/ET 後 MF))。在一些實施例中，骨髓增生性病變為原發性血小板增多症後骨髓纖維化(ET 後 MF)。在一些實施例中，骨髓增生性病變為真性紅細胞增多症後骨髓纖維化(PV 後 MF)。

JAK 相關性疾病或病狀之其他實例包括藉由投與本發明化合物來改善其他醫藥劑之皮膚學副作用。舉例而言，眾多醫藥劑會導致可表現為痤瘡樣皮疹或相關皮炎之不當過敏性反應。具有此等不當副作用之例示性醫藥劑包括抗癌藥物，諸如吉非替尼(gefitinib)、西妥昔單抗(cetuximab)、埃羅替尼(erlotinib)及其類似物。本發明化合物可與具有不當皮膚學副作用之醫藥劑組合(例如同時或依序)來全身性或局部(例如定位於皮炎附近)投與。在一些實施例中，本發明化合物可連同一或多種其他醫藥劑一起局部投與，其中該等其他醫藥劑在不存在本發明化合物下局部施用時會導致接觸性皮炎、過敏性接觸敏化或類似皮膚病症。因此，本發明組合物包括含有本發明化合物及會引起皮炎、皮膚病症或相關副作用之另一醫藥劑之局部調配物。

其他 JAK 相關性疾病包括發炎及發炎性疾病。例示性

發炎性疾病包括類肉瘤病、眼部發炎性疾病(例如虹膜炎、葡萄膜炎、鞏膜炎、結膜炎或相關疾病)、呼吸道發炎性疾病(例如上呼吸道(包括鼻及竇)發炎性疾病，諸如鼻炎或竇炎；或下呼吸道發炎性疾病，包括支氣管炎、慢性阻塞性肺病及其類似疾病)、發炎性肌病變(諸如心肌炎)及其他發炎性疾病。在一些實施例中，眼部發炎性疾病為睪炎。

其他 JAK 相關性疾病包括缺血再灌注損傷或與發炎性缺血事件(諸如中風或心跳停止)相關之疾病或病狀；內毒素驅動之疾病病況(例如在繞道手術之後的併發症或造成慢性心臟衰竭之慢性內毒素狀態)；諸如由癌症引起或與癌症相關之厭食、惡病質、疲勞；再狹窄；硬化性皮炎(sclerodermitis)；纖維化；與低氧或星形細胞膠質化(astrogliosis)相關之病狀，諸如糖尿病性視網膜病變、癌症或神經退化；及其他發炎性疾病，諸如全身性發炎性反應症候群(SIRS)及敗血性休克。

其他 JAK 相關性疾病包括痛風及歸因於例如良性前列腺肥大(benign prostatic hypertrophy/benign prostatic hyperplasia)之前列腺尺寸增加；以及骨再吸收疾病，諸如骨質疏鬆症或骨關節炎；與以下相關之骨再吸收疾病：激素不平衡及/或激素療法、自體免疫性疾病(例如骨類肉瘤病)或癌症(例如骨髓瘤)。

其他 JAK 相關性疾病包括乾眼病症。如本文所用，「乾眼病症」意欲涵蓋乾眼症研討會(Dry Eye Workshop, DEWS)

之新近官方報導中概述之疾病病況，該報導將乾眼症定義為「一種眼淚及眼表面之多因素疾病，其導致不適、視力障礙及淚膜不穩定症狀，且對眼表面具有潛在損害。其伴有淚膜之容積莫耳滲透濃度增加及眼表面發炎。」Lemp, 「The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop」, *The Ocular Surface*, 5(2), 75-92 2007 年 4 月，其以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，乾眼病症係選自水性淚缺乏性乾眼症(ADDE)或蒸發性乾眼病症或其適當組合。在一些實施例中，乾眼病症為休格連症候群乾眼症(Sjogren syndrome dry eye, SSDE)。在一些實施例中，乾眼病症為非休格連症候群乾眼症(non-Sjogren syndrome dry eye, NSSDE)。

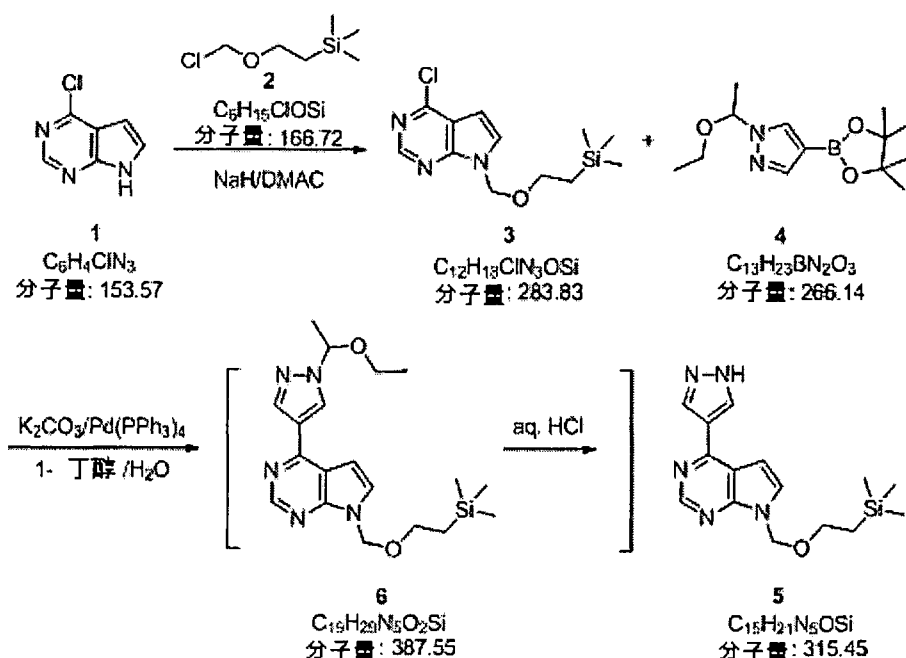
其他 JAK 相關性疾病包括結膜炎、葡萄膜炎(包括慢性葡萄膜炎)、脈絡膜炎、視網膜炎、睫狀體炎、鞏膜炎、上鞏膜炎或虹膜炎。其他 JAK 相關性疾病包括與病毒感染相關之呼吸功能障礙或衰竭，諸如流行性感冒及 SARS。

實例

本發明將藉助於特定實例更詳細地描述。下列實例係出於說明性目的而提供，且不欲以任何方式限制本發明。熟習此項技術者將容易地認識到可進行改變或修改以產生基本上相同結果之多種非關鍵參數。

實例 1. 合成 4-(1H-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)

乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5)



步驟 1. 4-氯-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(3)

在室溫下向配備有氮氣進口、加料漏斗、熱套管及機械攪拌器之燒瓶中添加 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(1, 600 g, 3.91 mol)及 *N,N*-二甲基乙醯胺(DMAC, 9.6 L)。混合物在冰/鹽水浴中冷卻至 0-5℃, 隨後在 0-5℃ 下分數份添加固體氫化鈉(NaH, 60 wt%, 174 g, 4.35 mol, 1.1 當量)。反應混合物在 15 分鐘之後變成深色溶液。接著以使內部反應溫度不超過 5℃ 之速率經由加料漏斗緩慢添加三甲基矽烷基乙氧基甲基氯(2, SEM-Cl, 763 mL, 4.31 mol, 1.1 當量)。接著在 0-5℃ 下攪拌反應混合物 30 分鐘。當藉由 TLC 及 HPLC 所測定確定反應完成時, 用水(1 L)淬滅反應混合物。接著用水(12 L)及甲基第三丁基醚(MTBE)(8 L)稀釋混合物。分離兩個層且水層用 MTBE(8 L)

萃取。合併之有機層用水(2 × 4 L)及鹽水(4 L)洗滌且溶劑轉換成 1-丁醇。粗產物(**3**)於 1-丁醇中之溶液不經進一步純化即用於後續鈴木(Suzuki)偶合反應中。或者，粗產物(**3**)於 MTBE 中之有機溶液經硫酸鈉(Na_2SO_4)乾燥。在減壓下移除溶劑。接著將殘餘物溶解於庚烷(2 L)中，過濾且裝載於矽膠(SiO_2 , 3.5 Kg)管柱上，用庚烷(6 L)、95%庚烷/乙酸乙酯(12 L)、90%庚烷/乙酸乙酯(10 L)及最終 80%庚烷/乙酸乙酯(10 L)溶離。合併含有所要純產物之溶離份且在減壓下濃縮得到呈淺黃色油狀之 4-氯-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(**3**, 987 g, 理論值 1109.8 g, 88.9%產率)，其在室溫下在靜置時部分固化成油狀固體。對於 **3**: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ 8.67 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz), 6.71 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 5.63 (s, 2H), 3.50 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 0.80 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 1.24 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 151.3, 150.8, 150.7, 131.5, 116.9, 99.3, 72.9, 65.8, 17.1, -1.48 ppm; $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OSi}$ (MW 283.83), LCMS (EI) m/e 284/286 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

步驟 2. 4-(1*H*-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(**5**)

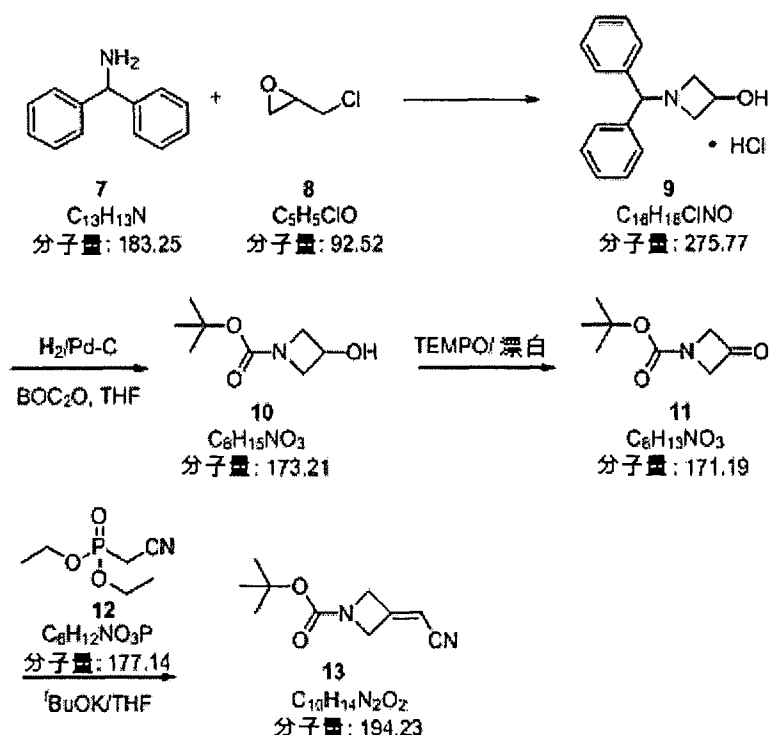
在室溫下向配備有頂置式攪拌器、冷凝器、熱套管及氮氣進口之反應器中裝入水(H_2O , 9.0 L)、固體碳酸鉀(K_2CO_3 , 4461 g, 32.28 mol, 2.42 當量)、4-氯-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(**3**, 3597

g, 12.67 mol)、1-(1-乙氧基乙基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼啉-2-基)-1*H*-吡啶(4, 3550 g, 13.34 mol, 1.05 當量)及 1-丁醇(27 L)。將所得反應混合物脫氣三次，每次用氮氣回填，隨後在室溫下用肆(三苯膦)鈀(0)(Pd(PPh₃)₄, 46 g, 0.040 mol, 0.003 當量)處理。加熱所得反應混合物至輕微回流(約 90°C)持續 1-4 小時。當藉由 HPLC 所測定確定反應完成時，逐漸冷卻反應混合物至室溫，隨後經矽藻土床過濾。矽藻土床用乙酸乙酯(2 × 2 L)洗滌，隨後合併濾液及洗滌溶液。分離兩個層，且水層用乙酸乙酯(12 L)萃取。在減壓下濃縮合併之有機層以移除溶劑，且粗 4-(1-(1-乙氧基乙基)-1*H*-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(6)不經進一步純化即直接與四氫呋喃(THF, 4.2 L)一起回裝至反應器中以隨後進行酸促進之脫保護反應。

在室溫下向反應器中如上所述製備之粗 4-(1-(1-乙氧基乙基)-1*H*-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶(6)於四氫呋喃(THF, 4.2 L)中的懸浮液中饋入水(H₂O, 20.8 L)及 10% HCl 水溶液(16.2 L, 45.89 mol, 3.44 當量)。在 16-30°C 下攪拌所得反應混合物 2-5 小時。當藉由 HPLC 分析確定反應完成時，反應混合物在室溫下用 30% 氫氧化鈉(NaOH)水溶液(4 L, 50.42 mol, 3.78 當量)處理。在室溫下攪拌所得反應混合物 1-2 小時。固體藉由過濾收集且用水(2 × 5 L)洗滌。濕濾餅與乙腈(21.6 L)一起回裝至反應器中，且加熱所得懸浮液至

輕微回流持續 1-2 小時。接著在攪拌下逐漸冷卻澄清溶液至室溫，且在冷卻下使固體自溶液沈澱析出。在室溫下再攪拌混合物 1-2 小時。固體藉由過濾收集，用乙腈 (2 × 3.5 L) 洗滌，且在烘箱中在 45-55°C 下在減壓下乾燥至恆重，得到呈白色結晶固體狀之 4-(1*H*-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶 (**5**，3281.7 g，理論值 3996.8 g，82.1%產率)(根據 HPLC，99.5 面積%)。對於 **5**：¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 13.41 (br. s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.67 (br. s, 1H), 8.35 (br. s, 1H), 7.72 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 5.61 (s, 2H), 3.51 (t, 2H, *J* = 8.2 Hz), 0.81 (t, 2H, *J* = 8.2 Hz), 0.13 (s, 9H) ppm; C₁₅H₂₁N₅OSi (MW, 315.45), LCMS (EI) *m/e* 316 (M⁺ + H)。

實例 2. 3-(氰基亞甲基)氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯 (13)



步驟 1. 1-二苯甲基氮雜環丁烷-3-醇鹽酸鹽(9)

二苯基甲胺(**7**, 2737 g, 15.0 mol, 1.04 當量)於甲醇(MeOH, 6 L)中之溶液在室溫下用來自加料漏斗之 2-(氯甲基)環氧乙烷(**8**, 1330 g, 14.5 mol)處理。在最初加料期間, 注意到輕微吸熱。所得反應混合物在室溫下攪拌 3 天, 隨後升溫至回流再持續 3 天。當 TLC 顯示確定反應完成時, 首先冷卻反應混合物至室溫且接著在冰浴中冷卻至 0-5°C。固體藉由過濾收集且用丙酮(4 L)洗滌, 得到第一批粗製所要產物(**9**, 1516 g)。在減壓下濃縮濾液且所得半固體用丙酮(1 L)稀釋。此固體接著藉由過濾收集得到第二批粗製所要產物(**9**, 221 g)。發現粗產物 1-二苯甲基氮雜環丁烷-3-醇鹽酸鹽(**9**, 1737 g, 理論值 3998.7 g, 43.4%產率)足夠純淨以致不經進一步純化即可用於後續反應中。對於 **9**: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz), 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; $C_{16}H_{18}ClNO$ (**9** 之游離鹼, $C_{16}H_{17}NO$ MW, 239.31), LCMS (EI) m/e 240 ($M^+ + H$)。

步驟 2. 3-羥基氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(**10**)

在室溫下攪拌 1-二苯甲基氮雜環丁烷-3-醇鹽酸鹽(**9**, 625 g, 2.27 mol)於 10%碳酸鈉水溶液(Na_2CO_3 , 5 L)及二氯甲烷(CH_2Cl_2 , 5 L)中之懸浮液直至所有固體溶解。分離兩個層, 且水層用二氯甲烷(CH_2Cl_2 , 2 L)萃取。合併之有機物萃取物經硫酸鈉(Na_2SO_4)乾燥且在減壓下濃縮。接著將 **9** 之此所得粗游離鹼溶解於 THF(6 L)中且將溶液置放入大帕爾高壓罐(Parr bomb)中。添加二碳酸二-第三丁酯(BOC_2O , 545 g, 2.5 mol, 1.1 當量)及 20%鈀(Pd)/碳(125 g, 50%潮濕)至帕爾高壓罐中。容器用氫氣(H_2)裝填至 30 psi 且在室溫下在穩定氫氣氛圍下(容器再裝填 3 次以維持壓力在 30 psi 下)攪拌 18 小時。當 HPLC 顯示反應完成時(當無更多氫氣被吸收時), 反應混合物經矽藻土墊過濾且矽藻土墊用 THF(4 L)洗滌。濾液在減壓下濃縮以移除溶劑且殘餘物與最小量之二氯甲烷(CH_2Cl_2)一起裝載於 Biotage 150 管柱上。管柱用含 20-50%乙酸乙酯之庚烷溶離且收集含有所要純產物(**10**)之溶離份併合併。在減壓下移除溶劑, 得到呈無色油狀之 3-羥基氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(**10**, 357 g, 理論值 393.2 g, 90.8%產率), 其在室溫下在真空中靜置後固化。對於 **10**: 1H NMR ($CDCl_3$,

300 MHz), δ 4.56 (m 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ppm。

步驟 3. 3-側氧基氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(11)

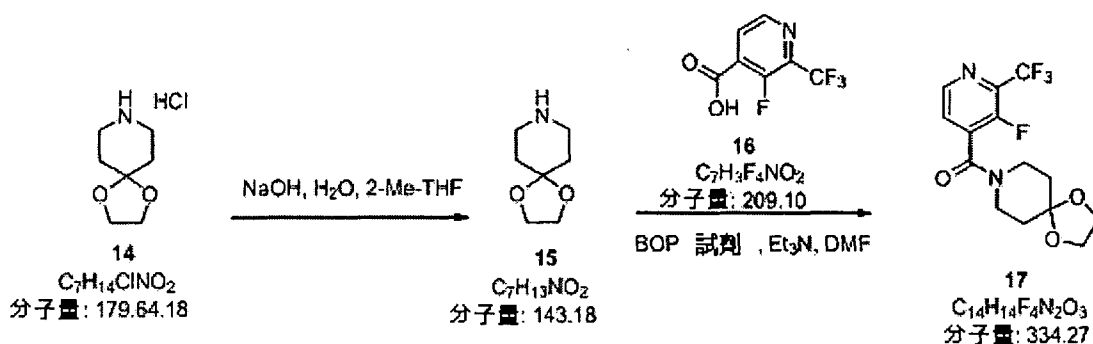
冷卻 3-羥基氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(**10**, 50 g, 289 mmol)於乙酸乙酯(400 mL)中之溶液至 0°C。所得溶液接著在 0-5°C 下用固體 TEMPO(0.5 g, 3.2 mmol, 0.011 當量)及溴化鉀(KBr, 3.9 g, 33.2 mmol, 0.115 當量)於水(60 mL)中之溶液處理。在保持反應溫度在 0-5°C 之間下, 添加碳酸氫鈉飽和水溶液(NaHCO_3 , 450 mL)及次氯酸鈉水溶液(NaClO , 10-13%可用氯, 450 mL)。添加次氯酸鈉之溶液後, 反應混合物之顏色即刻改變。當添加額外量之次氯酸鈉溶液時, 反應混合物之顏色逐漸消褪。當 TLC 顯示所有起始物質消耗時, 反應混合物之顏色不再改變。反應混合物接著用乙酸乙酯(EtOAc , 500 mL)稀釋且分離兩個層。有機層用水(500 mL)及氯化鈉飽和水溶液(500 mL)洗滌且經硫酸鈉(Na_2SO_4)乾燥。接著在減壓下移除溶劑得到粗產物 3-側氧基氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(**11**, 48 g, 理論值 49.47 g, 97%產率), 發現其足夠純淨且不經進一步純化即直接用於後續反應中。對於粗 **11**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), δ 4.65 (s, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm。

步驟 4. 3-(氰基亞甲基)氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(13)

在室溫下添加磷酸二乙酯氰基甲酯(**12**, 745 g, 4.20 mol, 1.20 當量)及無水四氫呋喃(THF, 9 L)至配備有熱套

管、加料漏斗及氮氣保護管之四頸燒瓶中。溶液用冰-甲醇浴冷卻至 -14°C 且在保持反應溫度低於 -5°C 下歷經 20 分鐘添加 1.0 M 第三丁醇鉀 (t-BuOK) 之無水四氫呋喃溶液 (THF, 3.85 L, 3.85 mol, 1.1 當量)。所得反應混合物在 -10°C 下攪拌 3 小時且在保持內部溫度低於 -5°C 下歷經 2 小時添加 1-第三丁氧基羰基-3-氮雜環丁酮 (**11**, 600 g, 3.50 mol) 於無水四氫呋喃 (THF, 2 L) 中之溶液。反應混合物歷經 1 小時在 -5 至 -10°C 下攪拌且接著緩慢升溫至室溫並在室溫下攪拌隔夜。反應混合物接著用水 (4.5 L) 及氯化鈉飽和水溶液 (NaCl, 4.5 L) 稀釋且用乙酸乙酯 (EtOAc, 2×9 L) 萃取。合併之有機層用鹽水 (6 L) 洗滌且經無水硫酸鈉 (Na_2SO_4) 乾燥。在減壓下移除有機溶劑且殘餘物用二氯甲烷 (CH_2Cl_2 , 4 L) 稀釋，隨後吸附於矽膠 (SiO_2 , 1.5 Kg) 上。吸附在矽膠上之粗產物藉由急驟管柱層析 (SiO_2 , 3.5 Kg, 0-25% EtOAc/己烷梯度溶離) 純化，得到呈白色固體狀之 3-(氰基亞甲基)氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯 (**13**, 414.7 g, 理論值 679.8 g, 61% 產率)。對於 **13**: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), δ 5.40 (m, 1H), 4.70 (m, 2H), 4.61 (m, 2H), 1.46 (s, 9H) ppm; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (MW, 194.23), LCMS (EI) m/e 217 ($\text{M}^+ + \text{Na}$)。

實例 3. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4,5]癸-8-基)甲酮(17)



步驟 1. 1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4.5]癸烷(15)

向配備有機械攪拌器、加料漏斗及隔板之 30 L 反應器中裝入氫氧化鈉(NaOH, 1.4 kg, 35 mol)及水(7 L, 3.13 kg, 17.43 mol)。向如此獲得之溶液中添加 1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4.5]癸烷鹽酸(14, 3.13 kg, 17.43 mol)。在 25℃ 下攪拌混合物 30 分鐘。溶液接著用氯化鈉(1.3 kg)飽和且用 2-甲基-四氫呋喃(3 × 7 L)萃取。合併之有機層用無水硫酸鈉(1.3 kg)乾燥，過濾且在 50℃ 下在減壓(70 mmHg)下濃縮。在減壓(80 mmHg, bp: 115℃ 至 120℃)下蒸餾如此獲得之黃色油狀物得到呈澄清油狀之化合物 15(2.34 kg, 16.36 mol, 93.8%)，其直接用於後續偶合反應中。

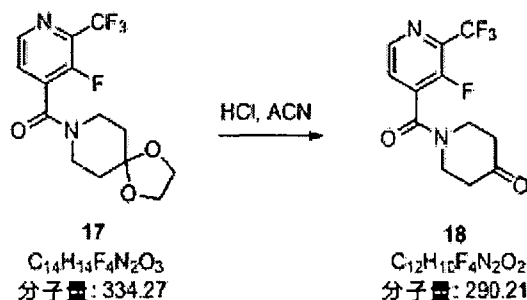
步驟 2. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4,5]癸-8-基)甲酮(17)

向配備有機械攪拌器、加料漏斗、溫度計及真空出口之乾燥 100 L 反應器中置放 3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼酸(16, 3.0 kg, 14.35 mol)、含六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基參(二甲胺基)磷(BOP 試劑, 7.6 kg, 17.2 mol, 1.20 當量)之二甲基甲醯胺(DMF, 18 L)。在攪拌下歷經 20 分鐘向

所得溶液中添加 1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4.5]癸烷 (**15**, 2.34 kg, 16.36 mol, 1.14 當量)。接著歷經 1 小時添加三乙胺 (Et_3N , 4 L, 28.67 mol, 2.00 當量)。在加料期間, 溫度保持在 5°C 與 10°C 之間。在 20°C 下攪拌如此獲得之深棕色溶液 12 小時且接著冷卻至 10°C 。在劇烈攪拌下, 依序添加 18 L 飽和碳酸氫鈉溶液及 36 L 水且溫度保持在 15°C 下。藉由過濾收集如此獲得之沈澱(濾餅)。水相接著用 12 kg 固體氯化鈉飽和且用 EtOAc ($2 \times 18 \text{ L}$) 萃取。合併之有機層依序用飽和碳酸氫鈉溶液 (18 L) 及水 ($2 \times 18 \text{ L}$) 洗滌。將來自先前過濾之濾餅再溶解於有機相中。如此獲得之深棕色溶液用每次 18 L 水洗滌兩次且接著在減壓 ($40\text{-}50^\circ\text{C}$, 30 mm Hg) 下濃縮得到 5.0 kg 呈黏稠棕色油狀之粗產物。在 50°C 下將以上獲得之粗產物 **17** 溶解於 EtOH (8.15 L) 中。歷經 30 分鐘添加水 (16.3 L)。向棕色溶液中加入晶種, 在攪拌下歷經 3 小時冷卻至 20°C 且在 20°C 下攪拌 12 小時。過濾形成之沈澱物, 用 EtOH 與水之混合物 ($\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O} = 1:20$, 2 L) 洗滌且在 60°C 下在減壓 (50 mmHg) 下乾燥 24 小時得到呈白色粉末狀之 (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (**17**, 3.98 kg, 11.92 mol, 83.1%)。對於 **17**: ^1H NMR (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.68 \text{ Hz}$, 1 H, NCH 在吡啶中), 7.92 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4.68 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HF}} = 4.68 \text{ Hz}$, 1 H, NCCH 在吡啶中), 3.87-3.91 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.70 (br s, 2 H, 一個 NCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCH_2 在哌啶環中, 兩者

均處於軸向位置), 3.26 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.86$ Hz, 2 H, 一個 NCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCH_2 在哌啶環中, 兩者均處於平展位置), 1.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.86$ Hz, 2 H, 一個 NCCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCCH_2 在哌啶環中, 兩者均處於平展位置), 1.58 (br s, 2 H, 一個 NCCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCCH_2 在哌啶環中, 兩者均處於軸向位置) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 161.03 (N-C=O), 151.16 (d, $^1J_{\text{CF}} = 266.03$ Hz, C-F), 146.85 (d, $^4J_{\text{CF}} = 4.32$ Hz, NCH 在吡啶中), 135.24 (d, $^2J_{\text{CF}} = 11.51$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C=O}$), 135.02 (四重峰, $^2J_{\text{CF}} = 34.57$ Hz, $\text{N}\underline{\text{C}}\text{CF}_3$), 128.24 (d, $^4J_{\text{CF}} = 7.48$ Hz, $\text{NC}\underline{\text{C}}\text{H}$ 在吡啶中), 119.43 (d $\times$ 四重峰, $^1J_{\text{CF}} = 274.38$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 4.89$ Hz, CF_3), 106.74 (OCO), 64.60 (OCCO), 45.34 (NC 在哌啶環中), 39.62 (NC 在哌啶環中), 34.79 (NCC 在哌啶環中), 34.10 (NCC 在哌啶環中) ppm; ^{19}F NMR (282 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ -64.69 (d, $^4J_{\text{FF}} = 15.85$ Hz, F_3C), -129.26 (d $\times$ 四重峰, $^4J_{\text{FF}} = 15.85$ Hz, $^4J_{\text{FH}} = 3.96$ Hz, FC) ppm; $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_3$ (MW, 334.27), LCMS (EI) m/e 335.1 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

實例 4. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基) (1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4,5]癸-8-基)甲酮(18)

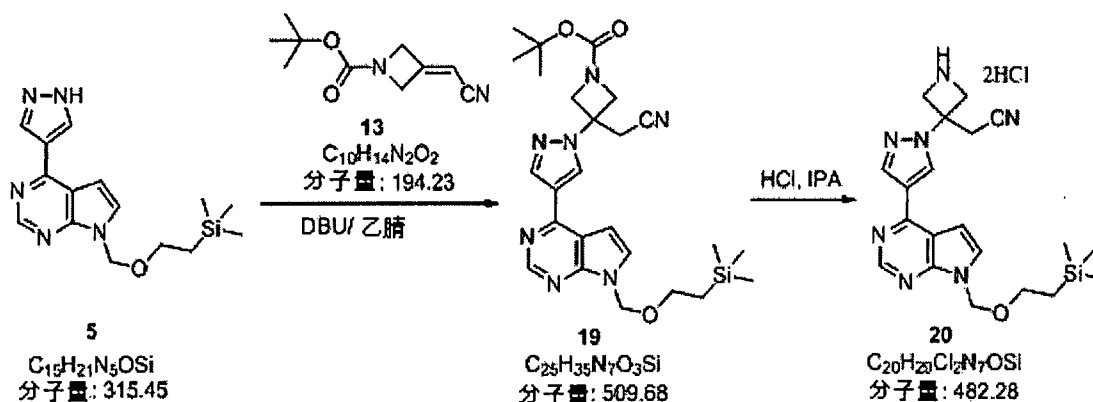


在室溫下在配備有機機械攪拌器、熱電偶、加料漏斗及

氮氣進口之 5 L 4 頸圓底燒瓶中置放含 (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧雜-8-氮雜螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (**17**, 100 g, 0.299 mol) 之乙腈 (ACN, 400 mL)。冷卻所得溶液至 10°C 以下。在使內部溫度保持低於 10°C 下向反應混合物中添加 6.0 N 鹽酸水溶液 (HCl, 450 mL, 2.70 mol, 9.0 當量)。所得反應混合物接著升溫至室溫且在室溫下在 8 小時內經由加料漏斗將額外量之 6.0 N 鹽酸水溶液 (HCl, 1050 mL, 6.30 mol, 21.0 當量) 緩慢引入反應混合物中。接著冷卻反應混合物至 0°C，隨後在使內部溫度保持低於 10°C 下用 30% 氫氧化鈉水溶液 (NaOH, 860 mL, 8.57 mmol, 28.6 當量) 處理。所得反應混合物接著升溫至室溫，隨後在 1 小時內添加固體碳酸氫鈉 (NaHCO₃, 85.0 g, 1.01 mol, 3.37 當量)。混合物接著用 EtOAc (2 × 1.2 L) 萃取，且合併之有機相用 16% 氯化鈉水溶液 (2 × 800 mL) 洗滌並藉由真空蒸餾濃縮至約 1.0 L。添加庚烷 (2.1 L) 至殘餘物中，且藉由真空蒸餾濃縮所得混合物至 1.0 L。向濃縮混合物中添加庚烷 (2.1 L)。所得白色漿料接著藉由真空蒸餾濃縮至 1.0 L。接著向白色漿料中添加甲基第三丁基醚 (MTBE, 1.94 L)。加熱白色混濁物至 40°C 獲得澄清溶液。所得溶液藉由真空蒸餾濃縮至約 1.0 L。在室溫下攪拌混合物 1 小時。在抽真空下藉由過濾收集白色沈澱物。濾餅用庚烷 (400 mL) 洗滌且在抽真空下在氮氣下於過濾器上乾燥，得到呈灰白色固體狀之化合物 **18** (78.3 g, 90.1%)。對於 **18**：¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.68 (d,

$^3J_{\text{HH}} = 4.69 \text{ Hz}$, 1 H, NCH 在吡啶中), 7.97 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4.69 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HF}} = 4.69 \text{ Hz}$, 1 H, NCCH 在吡啶中), 3.92 (br s, 2 H, 一個 NCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCH_2 在哌啶環中, 兩者均處於軸向位置), 3.54 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.15 \text{ Hz}$, 2 H, 一個 NCH_2 在哌啶環中, 另一個 NCH_2 在哌啶環中, 兩者均處於平展位置), 2.48 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.44 \text{ Hz}$, 2 H, NCCH_2), 2.34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.15 \text{ Hz}$, 2 H, NCCH_2) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, $^1J_{\text{CF}} = 266.89 \text{ Hz}$, C-F), 146.90 (d, $^4J_{\text{CF}} = 6.05 \text{ Hz}$, NCH 在吡啶中), 135.56 ($\text{C}-\text{C}=\text{O}$), 134.78-135.56 (m, NCCF_3), 128.27 (d, $^3J_{\text{CF}} = 7.19 \text{ Hz}$, NCCH 在吡啶中), 119.52 (d $\times$ 四重峰, $^1J_{\text{CF}} = 274.38 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{CF}} = 4.89 \text{ Hz}$, CF_3), 45.10 (NC 在哌啶環中) ppm, 一個碳 (NCC 在哌啶環中) 歸因於與 $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 重疊而缺失; ^{19}F NMR (282 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ -64.58 (d, $^4J_{\text{FF}} = 15.85 \text{ Hz}$, F_3C), -128.90 (d $\times$ 四重峰, $^4J_{\text{FF}} = 15.85 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{FH}} = 4.05 \text{ Hz}$, FC) ppm; $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (MW, 290.21), LCMS (EI) m/e 291.1 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

實例 5. 3-[4-(7-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈二鹽酸鹽(20)



步驟 1. 3-(氰基甲基)-3-(4-(7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基)氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(19)

在 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下在配備有機械攪拌器、溫度計、加料漏斗及真空出口之乾燥 30 L 反應器中置放 4-(1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5, 4.50 kg, 14.28 mol)、含 3-(氰基亞甲基)氮雜環丁烷-1-甲酸第三丁酯(13, 3.12 kg, 16.08 mol, 1.126 當量)之乙腈(9 L)。歷經 40 分鐘向所得粉紅色懸浮液中添加 1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(DBU, 225 mL, 1.48 mol, 0.10 當量)。在加料期間保持批料溫度在 10°C 與 20°C 之間。在 20°C 下攪拌所得棕色溶液 3 小時。在反應完成之後, 在 20°C 下在攪拌下歷經 80 分鐘添加水(18 L)。向混合物中加晶種且在室溫下攪拌加有晶種之混合物 12 小時。藉由過濾收集固體且濾餅用乙腈與水之混合物(1:2, 9 L)洗滌並在真空烘箱中在 60°C 下在氮氣淨化下乾燥 12 小時, 得到呈淡黃色粉末狀之粗產物(19, 7.34 kg)。在 60°C 下在配備有機械攪拌器、溫度計、加料漏斗及隔板之 50 L 反應器中將以上獲得之粗產物溶解於甲基第三

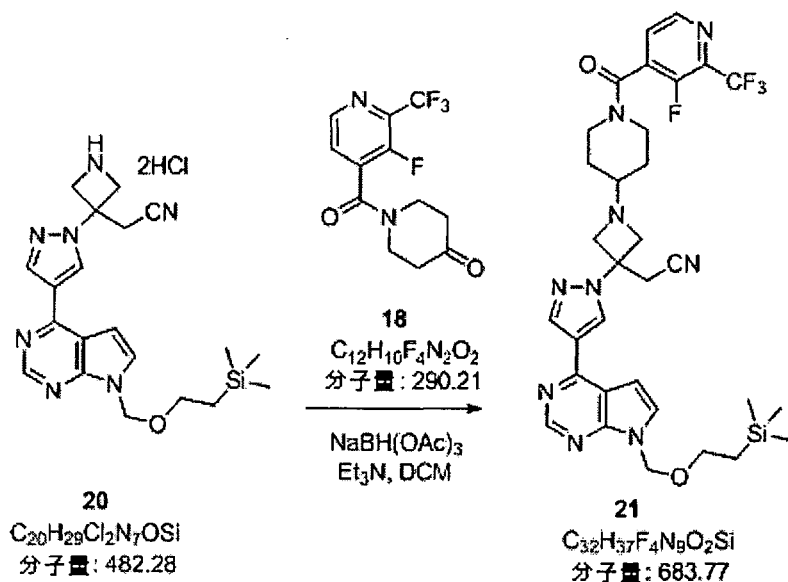
丁基醚 (MTBE, 22 L) 中。在 60°C 下歷經 1 小時添加己烷 (22 L)。接著向溶液中加晶種，歷經 3 小時冷卻至 20°C 且在 20°C 下攪拌 12 小時。藉由過濾收集沈澱。所得濾餅用 MTBE 與己烷之混合物 (1:15, 3 L) 洗滌且在真空烘箱中在 50°C 下乾燥 10 小時，得到呈白色粉末狀之化合物 **19** (6.83 kg, 13.42 mol, 94.0%)。對於 **19**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.87 (s, 1H), 8.46 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 8.36 (d, $J = 0.7$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.69 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 4.32 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 3.59-3.49 (m, 2H), 3.35 (s, 2H), 1.49 (s, 9H), 0.96-0.87 (m, 2H), -0.03--0.10 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 157.22, 153.67, 153.24, 151.62, 142.13, 130.16, 129.67, 124.47, 116.72, 115.79, 102.12, 82.54, 74.23, 68.01, 60.25, 58.23, 29.65, 29.52, 19.15, -0.26 ppm; $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_3\text{Si}$ (MW, 509.68), LCMS (EI) m/e 510.1 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

步驟 2. 3-[4-(7-{[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮雜環丁烷-3-基}乙腈二鹽酸鹽(**20**)

在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下在配備有機械攪拌器、熱電偶、加料漏斗及氮氣進口之 2 L 4 頸圓底燒瓶中添加化合物 **19** (55.0 g, 0.108 mol) 及甲醇 (MeOH, 440 mL)。在室溫下攪拌所得白色混濁物 20 分鐘得到淡黃色溶液。接著經由加料漏斗在 5 分鐘內添加鹽酸 (HCl) 於異丙醇中之溶液 (5.25 M, 165 mL, 0.866 mol, 8.02 當量) 至反應混合物中。接著藉

由加熱包加熱所得反應混合物至 40℃。在 40℃ 下 2 小時之後，在 40℃ 下經由加料漏斗添加水(165 mL, 9.17 mol, 84.8 當量)至反應混合物中得到淡綠色溶液。在 40℃ 下經由加料漏斗添加甲基第三丁基醚(MTBE, 440 mL)至所得混合物中。緩慢冷卻所得混合物至 10℃。固體藉由過濾收集且用 MTBE(2 × 220 mL)洗滌。在抽真空下在氮氣下於過濾器中乾燥白色固體 18 小時得到化合物 **20**(52.2 g, KF 水含量 5.42%, 產率 94.9%)。對於 **20**: ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 10.39 (brs, 1H), 10.16 (brs, 1H), 9.61 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.27-8.21 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.72-7.66 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 5.82 (s, 2H), 4.88-4.77 (m, 2H), 4.53-4.44 (m, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.69-3.60 (m, 2H), 0.98-0.89 (m, 2H), 0.01 (s, 9H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 151.25, 146.45, 145.09, 140.75, 133.38, 132.44, 116.20, 116.09, 112.79, 102.88, 73.07, 66.14, 59.16, 53.69, 26.44, 17.15, -1.36 ppm; $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{OSi}$ (**20** 之游離鹼, $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{OSi}$, MW 409.56), LCMS (EI) m/e 410.2 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

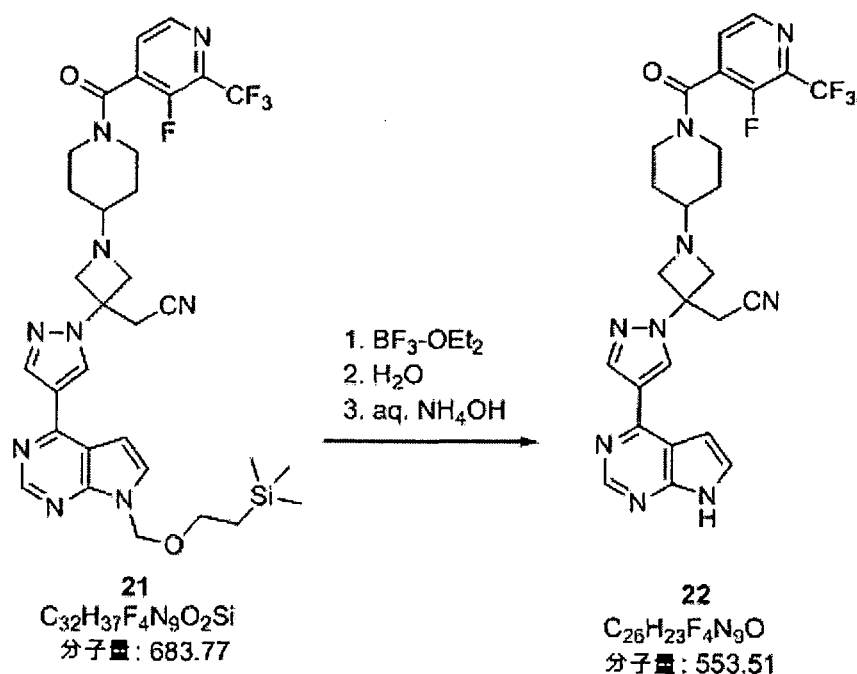
實例 6. 2-(1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基)哌啶-4-基)-3-(4-(7-((2-(三甲基矽烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基)氮雜環丁烷-3-基)乙腈 (21)



在 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下在配備有機械攪拌器、熱電偶、冷凝器及氮氣進口之 100 L 乾燥反應器中添加 (20, 3.24 kg, 6.715 mol) 及二氯甲烷 (32 L)。在室溫下攪拌混合物 10 分鐘，隨後用三乙胺 (TEA, 1.36 kg, 13.44 mol, 2.00 當量) 在保持內部溫度在 $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 下之加料速率下處理。接著在室溫下添加化合物 18 (2.01 kg, 6.926 mol, 1.03 當量) 至反應器中。在 10 分鐘之後，在使內部溫度保持在 $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 下在 1 小時內逐份添加三乙醯氧基硼氫化鈉 ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 2.28 kg, 10.75 mol, 1.60 當量) 至反應器中。在 $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 下再攪拌所得反應混合物 1 小時。一旦確定還原性胺化反應完成，反應混合物即用 4% 碳酸氫鈉水溶液 (NaHCO_3 , 32 L) 處理以將 pH 值調整至 7-8。在室溫下攪拌 30 分鐘之後，分離兩個相。水相用二氯甲烷 (29 L) 萃取。合併之有機相依序用 0.1 N 鹽酸水溶液 (16 L)、4% 碳酸氫鈉水溶液 (16 L)、8% 氯化鈉水溶液 ($2 \times 16\text{ L}$) 洗滌。部分濃縮所得有機相且過濾。藉由在真空下逐漸添加乙腈 (65 L) 來對濾

液進行溶劑交換。白色固體藉由過濾收集，用乙腈(10 L)洗滌且在真空烘箱中在 40-50°C 下在氮氣淨化下乾燥，得到化合物 **21**(4.26 kg, 6.23 mol, 92.9%)。對於 **21**：¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.84 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.90 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.07 (dt, *J* = 11.1, 4.9 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.57 (dd, *J* = 10.2, 7.8 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.52 (dd, *J* = 8.5, 7.4 Hz, 2H), 3.41 (dq, *J* = 13.3, 4.3 Hz, 1H), 3.26 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.07 (ddd, *J* = 13.1, 9.4, 3.2 Hz, 1H), 2.56 (dt, *J* = 8.5, 4.7 Hz, 1H), 1.81-1.73 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.21 (m, 1H), 0.82 (dd, *J* = 8.5, 7.4 Hz, 2H), -0.12 (s, 9H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ 161.68, (154.91, 152.27), 153.08, 152.69, 151.53, 147.69, 140.96, (136.19, 136.02), (136.48, 136.36, 136.13, 136.0, 135.78, 135.66, 135.43, 135.32), 131.43, 130.84, 129.03, (126.17, 123.42, 120.69), 117.99, 122.77, 118.78, 114.71, 102.02, 73.73, 67.04, 62.86, 61.88, 58.51, 45.63, 30.03, 29.30, 28.60, 18.52, 0.00 ppm; C₃₂H₃₇F₄N₉O₂Si (MW, 683.77), LCMS (EI) *m/e* 684.2 (M⁺ + H)。

實例 7. 2-(3-(4-(7H-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基)-1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基)哌啶-4-基)氮雜環丁烷-3-基)乙腈(**22**)

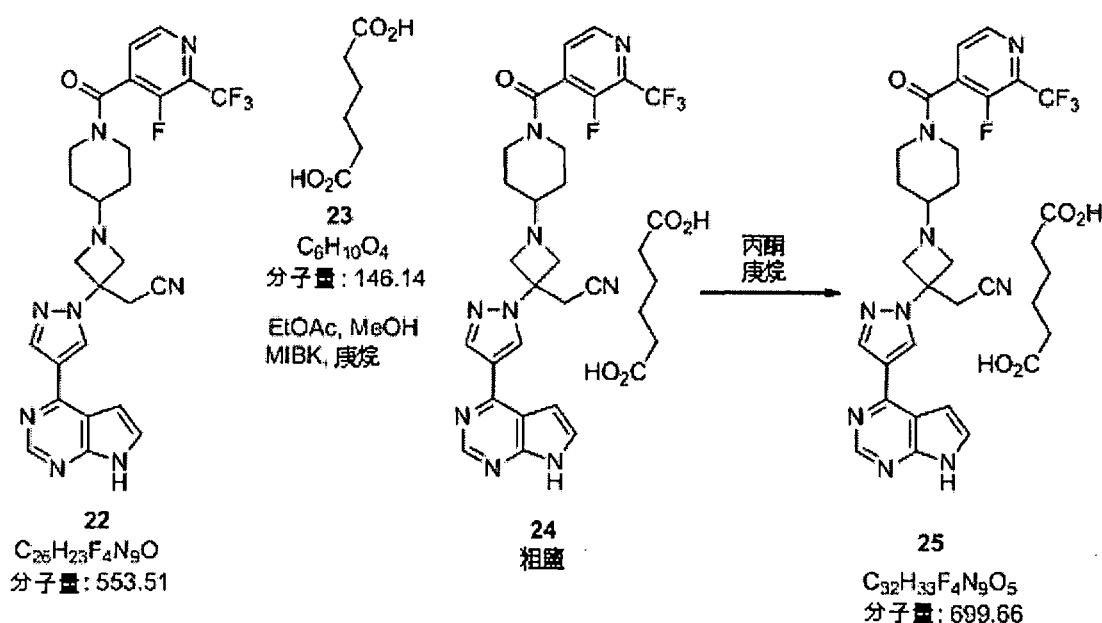


在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下向配備有機械攪拌器、熱電偶、加料漏斗及氮氣進口之 250 mL 4 頸圓底燒瓶中添加化合物 **21** (9.25 g, 13.52 mmol, KF 水含量 3.50%) 及乙腈 (74 mL)。冷卻所得白色漿料至 5°C 以下。接著以同時使內部溫度保持低於 5.0°C 之速率添加乙醚合三氟化硼 ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, 6.46 mL, 51.37 mmol, 3.80 當量)。反應混合物接著升溫至 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 。在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下攪拌 18 小時之後，冷卻反應混合物至 $0-5^\circ\text{C}$ 且在低於 5.0°C 下將額外量之 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.34 mL, 2.70 mmol, 0.2 當量) 引入反應混合物中。所得反應混合物升溫至 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ，且在室溫下再保持攪拌 5 小時。接著冷卻反應混合物至 $0-5^\circ\text{C}$ ，隨後添加水 (12.17 mL, 0.676 mol, 50 當量)。在添加水期間保持內部溫度低於 5.0°C 。所得混合物升溫至 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 且在室溫下保持攪拌 2 小時。接著冷卻反應混合物至 $0-5^\circ\text{C}$ 且添加氫氧化銨水溶液 (NH_4OH , 5 N, 121.7 mmol, 9.0 當量)。在添加氫氧化銨

水溶液期間，內部溫度保持低於 5.0°C 。所得反應混合物升溫至 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 且在室溫下攪拌 20 小時。一旦確定 SEM 脫保護完成，即過濾反應混合物，且固體用 EtOAc (9.25 mL) 洗滌。合併濾液且用 EtOAc (74 mL) 稀釋。稀釋之有機溶液用 13% 氯化鈉水溶液 (46.2 mL) 洗滌。有機相接著用 EtOAc (55.5 mL) 稀釋，隨後在減壓下濃縮至最小體積。添加 EtOAc (120 mL) 至殘餘物中，在 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下攪拌所得溶液 30 分鐘。溶液接著用 7% 碳酸氫鈉水溶液 (2×46 mL) 及 13% 碳酸氫鈉水溶液 (46 mL) 洗滌。所得有機相用 EtOAc (46 mL) 稀釋且在 $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下用水 (64 mL) 處理 30 分鐘。冷卻混合物至 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 且分離兩個相。有機相在 $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下第二次用水 (64 mL) 處理 30 分鐘。冷卻混合物至 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 且分離兩個相。濃縮所得有機相得到粗化合物 **22** (游離鹼)，其藉由管柱層析 (SiO_2 , 330 g, 用含 0-10% MeOH 之 EtOAc 梯度溶離) 進一步純化得到呈灰白色固體狀之分析純游離鹼 (**22**, 7.00 g, 93.5%)。對於 **22**: ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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; ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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; $C_{26}H_{23}F_4N_9O$ (MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.1 ($M^+ + H$)。

實例 8. 2-(3-(4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基)-1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基)哌啶-4-基)氮雜環丁烷-3-基)乙腈己二酸鹽(25)



步驟 1. 2-(3-(4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基)-1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基)哌啶-4-基)氮雜環丁烷-3-基)乙腈己二酸鹽粗鹽(24)

遵循實例 7 中製備化合物 **22** 之方法，例外之處為最終有機相藉由真空蒸餾濃縮至最小體積以得到粗化合物

22，其不經分離而直接用於後續己二酸鹽形成方法中。在室溫下向含有粗化合物 **22** 之濃縮殘餘物中添加甲醇 (200 mL)。混合物藉由真空蒸餾濃縮至最小體積。接著向殘餘物中添加甲醇 (75 mL) 且加熱所得溶液至回流持續 2 小時。添加甲基異丁基酮 (MIBK, 75 mL) 至溶液中且所得混合物在使內部溫度保持在 40-50°C 下在真空下蒸餾至約 30 mL。添加甲醇 (75 mL) 且加熱所得混合物至回流持續 2 小時。向溶液中添加 MIBK (75 mL)。在使內部溫度保持在 40-50°C 下在真空下再次蒸餾混合物至約 30 mL。向溶液中添加己二酸 (**23**, 2.15 g, 14.77 mmol) 於甲醇 (75 mL) 中之溶液。接著加熱所得溶液至回流持續 2 小時。添加 MIBK (75 mL)。在使內部溫度保持在 40-50°C 下在真空下蒸餾混合物至約 60 mL。停止加熱且歷經 1-2 小時添加庚烷 (52.5 mL)。在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下攪拌所得混合物 3-4 小時。白色沈澱物藉由過濾收集，且濾餅用庚烷 ($2 \times 15\text{ mL}$) 洗滌。在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下在抽真空下在氮氣下於過濾器上乾燥固體 12 小時，得到化合物 **24** (粗己二酸鹽, 8.98 g, 12.84 mmol, 95.0%)。對於 **24**： ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 12.16 (s, 1H), 12.05 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.69 (d, $J = 4.7\text{ Hz}$, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, $J = 4.7\text{ Hz}$, 1H), 7.63 (dd, $J = 3.6, 2.3\text{ Hz}$, 1H), 7.09 (dd, $J = 3.6, 1.7\text{ Hz}$, 1H), δ 4.11 (dt, $J = 11.0, 4.4\text{ Hz}$, 1H), 3.77 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$, 2H), 3.60 (t, $J = 7.8\text{ Hz}$, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.44 (dt, $J = 14.4, 4.6\text{ Hz}$, 1H), 3.28 (t, $J = 10.4\text{ Hz}$, 1H), 3.09 (ddd, $J = 13.2, 9.6, 3.2\text{ Hz}$,

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; ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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; $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_5$ (分子量: 699.66; **24**: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}$, MW 553.51), LCMS (EI) m/e 554.0 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

步驟 2. 2-(3-(4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基)-1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)異菸鹼鹽基)哌啶-4-基)氮雜環丁烷-3-基)乙腈己二酸鹽(**25**)

在配備有機械攪拌器、熱電偶、加料漏斗及氮氣進口之 100 L 乾燥反應器中添加化合物 **24**(3.40 4.86 mol)及丙酮(23.8 L)。加熱所得白色混濁物至 55-60°C 得到澄清溶液。所得溶液經線上過濾器過濾至另一 100 L 反應器中。庚烷(23.8 L)經線上過濾器過濾至單獨 50 L 反應器中。接著在 100 L 反應器中將經過濾之庚烷以使內部溫度保持在 55-60°C 下之速率饋入丙酮溶液中。接著冷卻 100 L 反應器中之反應混合物至 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 且在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下攪拌 16 小時。白色沈澱物藉由過濾收集且濾餅用庚烷(2×5.1 L)洗滌且在抽真空下在氮氣下於過濾器上乾燥。固體進一

步在真空烘箱中在 55-65°C 下在氮氣淨化下乾燥，得到呈白色至灰白色粉末狀之化合物 **25** (3.11 kg, 92.2%)。對於 **25** : ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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; ^{13}C NMR (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) 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; $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}_5$ (分子量 : 699.66; 游離鹼 : $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{F}_4\text{N}_9\text{O}$ (MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.0 ($\text{M}^+ + \text{H}$)。

實例 A：活體外 JAK 激酶分析

根據 Park 等人, *Analytical Biochemistry* **1999**, 269, 94-104 中所述之以下活體外分析測試本文式 I 化合物對 JAK 目標之抑制活性。使用桿狀病毒在昆蟲細胞中表現具

有 N 端 His 標籤的人類 JAK1(a.a. 837-1142)及 JAK2(a.a. 828-1132)之催化域且加以純化。藉由量測生物素化肽之磷酸化來分析 JAK1 及 JAK2 之催化活性。藉由均質時間解析螢光(homogenous time resolved fluorescence ; HTRF)偵測磷酸化肽。在於含 100 mM NaCl、5 mM DTT 及 0.1 mg/mL(0.01%)BSA 之 50 mM Tris(pH 7.8)緩衝液中含有酶、ATP 及 500 nM 肽的 40 μ L 反應中量測化合物針對各激酶之 IC_{50} 。對於 1 mM IC_{50} 量測,反應中之 ATP 濃度為 1 mM。在室溫下進行反應 1 小時且接著用 20 μ L 含 45 mM EDTA、300 nM SA-APC、6 nM Eu-Py20 之分析緩衝液(Perkin Elmer, Boston, MA)終止。與銻標記抗體之結合進行 40 分鐘且在 Fusion 盤讀取器(Perkin Elmer, Boston, MA)上量測 HTRF 信號。實例 1 之化合物及己二酸鹽對 JAK1 之 $IC_{50} \leq 5$ nM(在 1 mM ATP 下量測),其中 JAK2/JAK1 比率 > 10 (在 1 mM ATP 下量測)。

實例 B：細胞分析

生長依賴於細胞激素且因此依賴於 JAK/STAT 信號轉導之癌細胞株可於 RPMI 1640、10% FBS 及 1 ng/mL 適當細胞激素中以每孔(96 孔盤格式)6000 個細胞塗鋪。化合物可於 DMSO/培養基(最終濃度 0.2% DMSO)中添加至細胞中且在 37°C、5% CO₂ 下培育 72 小時。使用 CellTiter-Glo 發光細胞活力分析(Promega),隨後進行 TopCount(Perkin Elmer, Boston, MA)定量來評估化合物對細胞活力之影響。使用分析讀數相同之非 JAK 驅動之細胞株並行量測

化合物之潛在脫靶 (off-target) 效應。所有實驗通常皆一式兩份進行。

以上細胞株亦可用於檢查化合物對 JAK 激酶或潛在下游受質(諸如 STAT 蛋白質、Akt、Shp2 或 Erk)之磷酸化之影響。此等實驗可在細胞激素饑餓隔夜，隨後與化合物一起短暫預培育(2 小時或 2 小時以下)且細胞激素刺激約 1 小時或 1 小時以下之後進行。接著自細胞萃取蛋白質且藉由此項技術中之經訓練者所熟知之技術進行分析，該等技術包括使用可區分磷酸化蛋白質與總蛋白質之抗體進行西方墨點分析(Western blotting)或 ELISA。此等實驗可利用正常細胞或癌細胞來研究化合物對腫瘤細胞存活生物學或對發炎性疾病之介體的活性。舉例而言，對於後者而言，可使用諸如 IL-6、IL-12、IL-23 或 IFN 之細胞激素來刺激 JAK 活化，從而導致 STAT 蛋白質磷酸化且可能導致轉錄概況變化(藉由陣列或 qPCR 技術評估)或產生及/或分泌諸如 IL-17 之蛋白質。可使用此項技術中之經訓練者常用之技術量測化合物抑制此等細胞激素介導之效應的能力。

亦可在設計用來評估本文化合物針對突變型 JAK(例如骨髓增生性病變中所發現之 JAK2V617F 突變)之效能及活性之細胞模型中測試本文化合物。此等實驗常利用血液譜系之其中異位表現野生型或突變型 JAK 激酶的細胞激素依賴性細胞(例如 BaF/3)(James, C. 等人 *Nature* 434:1144-1148; Staerk, J. 等人 *JBC* 280:41893-41899)。

終點包括化合物對細胞存活、增殖及磷酸化 JAK、STAT、Akt 或 Erk 蛋白質之影響。

可評估本文某些化合物抑制 T 細胞增殖之活性。該種分析可視為第二細胞激素(亦即 JAK)驅動之增殖分析以及對免疫活化之免疫遏制或抑制的簡化分析。以下為可如何進行此等實驗之簡要概述。使用菲科爾希帕克(Ficoll Hypaque)分離方法自人類全血樣品製備周邊血液單核細胞(PBMC)且可藉由淘選自 PBMC 獲得 T 細胞(2000 部分)。新鮮分離之人類 T 細胞可在 37°C 下以密度 2×10^6 個細胞/毫升維持在培養基(補充有 10%胎牛血清、100 U/ml 青黴素、100 µg/ml 鏈黴素之 RPMI 1640)中至多 2 天。對於 IL-2 刺激之細胞增殖分析，T 細胞首先用最終濃度為 10 µg/mL 之植物血球凝集素(Phytohemagglutinin, PHA)處理 72 小時。在用 PBS 洗滌一次之後，於 96 孔盤中每孔塗鋪 6000 個細胞且以於培養基中不同濃度之化合物在 100 U/mL 人類 IL-2(ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel)存在下處理。各盤在 37°C 下培育 72 小時且遵循製造商建議之方案使用 CellTiter-Glo 發光試劑(Promega; Madison, WI)評估增殖指數。

實例 C：活體內抗腫瘤功效

可在免疫受損小鼠中之人類腫瘤異種移植模型中評估本文化合物。舉例而言，可使用 INA-6 漿細胞瘤細胞株之致腫瘤變異體皮下接種 SCID 小鼠(Burger, R.等人 *Hematol J.* 2:42-53, 2001)。攜帶腫瘤之動物可接著隨機

分成藥物或媒劑治療組且可藉由許多常用途徑投與不同劑量之化合物，包括經口、腹膜內或使用可植入泵進行連續輸注投與。使用測徑規追蹤腫瘤隨時間之生長。此外，可在治療起始後之任何時間收集腫瘤樣品以供如上(實例 B)所述進行分析來評估化合物對 JAK 活性及下游信號傳導路徑之影響。此外，可使用由其他已知激酶(例如 Bcr-Abl)驅動之異種移植腫瘤模型，諸如 K562 腫瘤模型評估化合物之選擇性。

實例 D：鼠類皮膚接觸遲發性過敏反應測試

亦可測試本文化合物在 T 細胞驅動之鼠類遲發性過敏測試模型中之功效(抑制 JAK 目標之功效)。鼠類皮膚接觸遲髮型過敏(DTH)反應視為臨床接觸性皮炎及其他 T 淋巴細胞介導之免疫皮膚病症(諸如牛皮癬)之有效模型(*Immunol Today*. 1998 年 1 月;19(1):37-44)。鼠類 DTH 與牛皮癬共有多種特徵，包括免疫浸潤、伴有發炎性細胞激素增加及角化細胞過度增殖。此外，在臨床上有效治療牛皮癬之許多類別之藥劑亦為小鼠中之 DTH 反應的有效抑制劑(*Agents Actions*. 1993 年 1 月;38(1-2):116-21)。

在第 0 及 1 天，用抗原 2,4,二硝基-氟苯(DNFB)對 Balb/c 小鼠之剃過毛的腹部局部施用來使其敏化。在第 5 天，使用工程師用測微器量測耳之厚度。記錄此量測結果且用作基線。動物之雙耳接著均藉由局部施用總計 20 μL (10 μL 在內耳廓上且 10 μL 在外耳廓上)濃度為 0.2%之 DNFB 進行攻擊。在攻擊後 24 至 72 小時，再次量測耳。在整

個敏化及攻擊階段期間(第-1 天至第 7 天)或在攻擊階段之前及整個攻擊階段期間(通常在第 4 天下午至第 7 天)給與測試化合物治療。全身性或局部(向耳局部施用治療)投與測試化合物(以不同濃度)之治療。測試化合物之功效由相較於未治療情形之耳腫脹減輕指示。引起減輕 20%或 20%以上之化合物視為有效。在一些實驗中，小鼠受到攻擊但未敏化(陰性對照)。

測試化合物之抑制效應(抑制 JAK-STAT 路徑之活化)可藉由免疫組織化學分析進行確認。JAK-STAT 路徑之活化會導致功能性轉錄因子之形成及易位。此外，免疫細胞之流入及角化細胞之增殖增加亦應提供耳中可進行研究及定量之獨特表現概況變化。使用與磷酸化 STAT3 特異性相互作用之抗體(純系 58E12, Cell Signaling Technologies)，對經福馬林固定且經石蠟包封之耳切片(在 DTH 模型中於攻擊階段之後收集)進行免疫組織化學分析。小鼠耳用測試化合物、媒劑或地塞米松(dexamethasone)(一種用於牛皮癬之臨床有效治療劑)處理，或在 DTH 模型中不經任何處理以供比較。測試化合物及地塞米松在定性與定量兩者上均可產生類似轉錄變化，且測試化合物與地塞米松兩者均可降低浸潤細胞數。全身性投與測試化合物與局部投與測試化合物兩者均可產生抑制效應，亦即降低浸潤細胞數及抑制轉錄變化。

實例 E：活體內消炎活性

可在設計用來重複單一或複雜發炎反應之齧齒動物或

非齧齒動物模型中評估本文化合物。舉例而言，可使用齧齒動物關節炎模型來評估預防性或治療性給與之化合物的治療潛力。此等模型包括(但不限於)小鼠或大鼠膠原蛋白誘發之關節炎、大鼠佐劑誘發之關節炎及膠原蛋白抗體誘發之關節炎。包括(但不限於)多發性硬化症、第 I 型糖尿病、葡萄膜視網膜炎、甲狀腺炎、重症肌無力、免疫球蛋白腎病變、心肌炎、氣道敏化(哮喘)、狼瘡或結腸炎在內之自體免疫性疾病亦可用於評估本文化合物之治療潛力。此等模型在研究團體中已充分確立且為此項技術中之經訓練者所熟知 (Current Protocols in Immunology, 第 3 卷, Coligan, J.E. 等人, Wiley Press.; *Methods in Molecular Biology*: 第 225 卷, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. 及 Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.)。

實例 F：關於乾眼症、葡萄膜炎及結膜炎治療之動物模型

可在此項技術中之經訓練者已知之一或多個臨床前乾眼症模型中評估藥劑，該等模型包括(但不限於)兔伴刀豆凝集素 A (concanavalin A, ConA) 淚腺模型、莨菪鹼 (scopolamine) 小鼠模型 (皮下或經皮)、肉毒桿菌 (Botulinum) 小鼠淚腺模型，或導致眼腺功能障礙之許多自發性齧齒動物自體免疫模型 (例如 NOD-SCID、MRL/lpr 或 NZB/NZW) 中之任一者 (Barabino 等人, Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 及 Schrader 等人,

Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312 , 其各自以全文引用的方式併入本文中)。此等模型中之終點可包括眼腺及眼(角膜等)之組織病理學且可能包括量測淚產生之典型斯戈默(Schirmer)測試或其改進形式(Barabino 等人)。可藉由可在可量測疾病存在之前或之後開始的經由多種投藥途徑(例如全身性或局部)給藥來評估活性。

可在此項技術中之經訓練者已知之一或多個臨床前葡萄膜炎模型中評估藥劑。其包括(但不限於)實驗性自體免疫性葡萄膜炎(EAU)及內毒素誘發之葡萄膜炎(EIU)模型。EAU 實驗可在兔、大鼠或小鼠中進行且可涉及被動或主動免疫。舉例而言，可使用許多視網膜抗原中之任一者使動物對相關免疫原敏感，此後可用相同抗原對動物進行經眼攻擊。EIU 模型更急性且涉及以低於致死劑量局部或全身性投與脂多醣。EIU 模型與 EAU 模型兩者之終點均可尤其包括眼底鏡檢查、組織病理學。此等模型由 Smith 等人 (Immunology and Cell Biology 1998, 76, 497-512, 其以全文引用的方式併入本文中)評述。藉由可在可量測疾病存在之前或之後開始的經由多種投藥途徑(例如全身性或局部)給藥來評估活性。以上所列之一些模型亦可能發展鞏膜炎/上鞏膜炎、脈絡膜炎、睫狀體炎或虹膜炎且因此適用於研究化合物治療性治療此等疾病之潛在活性。

亦可在此項技術中之經訓練者已知之一或多個臨床前

結膜炎模型中評估藥劑。其包括(但不限於)利用天竺鼠、大鼠或小鼠之齧齒動物模型。天竺鼠模型包括利用以諸如卵清蛋白(ovalbumin)或豬草(ragweed)之抗原進行之主動或被動免疫及/或免疫攻擊方案的模型(評述於 Groneberg, D.A.等人, *Allergy* 2003, 58, 1101-1113 中, 其以全文引用的方式併入本文中)。大鼠及小鼠模型在整體設計方面類似於天竺鼠中之模型(亦由 Groneberg 評述)。可藉由可在可量測疾病存在之前或之後開始的經由多種投藥途徑(例如全身性或局部)給藥來評估活性。此等研究之終點可包括例如對諸如結膜之眼組織進行之組織學、免疫學、生物化學或分子分析。

實例 G：骨之活體內保護

可在此項技術中之經訓練者所已知的骨量減少、骨質疏鬆症或骨再吸收之各種臨床前模型中評估化合物。舉例而言, 可使用切除卵巢之齧齒動物來評估化合物影響骨重塑及/或骨密度之徵象及標記的能力(W.S.S. Jee 及 W. Yao, *J Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207, 其以全文引用的方式併入本文中)。或者, 可在療法(例如糖皮質激素)誘發之骨量減少模型中在對照或化合物治療之齧齒動物中評估骨密度及結構(Yao 等人 *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; 及同上 58(11), 1674-1686, 其兩者均以全文引用的方式併入本文中)。此外, 可在以上(實例 E)論述之齧齒動物關節炎模型中評估化合物對骨再吸收及密度之影響。所有此

等模型之終點皆可變化但常包括組織學及放射學評估以及骨重塑之免疫組織學及適當生物化學標記。

已描述本發明之許多實施例。然而，應瞭解可在不脫離本發明之精神及範疇下作出各種修改。因此，其他實施例在以下申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

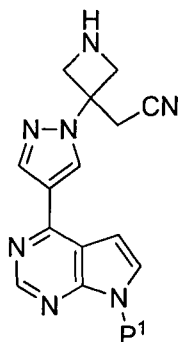
無

【主要元件符號說明】

無

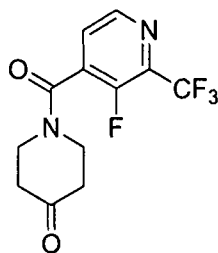
七、申請專利範圍：

1. 一種方法，其包含使式 III 化合物：



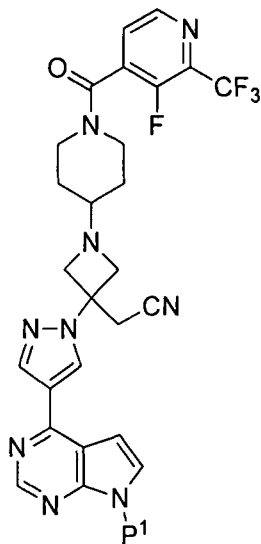
III

或其鹽與式 IV 化合物：



IV

在還原劑存在下反應以形成式 II 化合物：

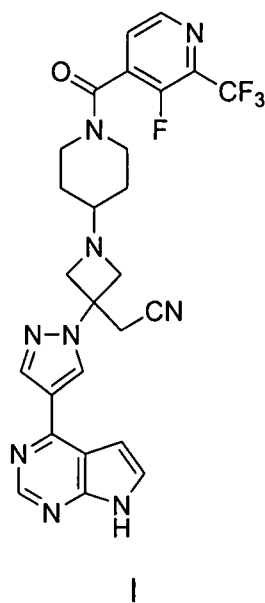


II

或其鹽，其限制條件為該還原劑不為氰基硼氫化鈉；

其中 P¹ 為保護基。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該保護基為 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。
3. 如申請專利範圍第 1 項至第 2 項中任一項之方法，其中該還原劑係選自氰基硼氫化鈉及三乙醯氧基硼氫化鈉。
4. 如申請專利範圍第 1 項至第 2 項中任一項之方法，其中該還原劑為三乙醯氧基硼氫化鈉。
5. 如申請專利範圍第 1 項至第 2 項中任一項之方法，其中式 II、式 III 及式 IV 之該等化合物各自為游離鹼。
6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含使式 II 化合物或其該鹽脫保護以形成式 I 化合物：



或其鹽。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該脫保護包含用乙醚合三氟化硼處理，隨後用氫氧化銨水溶液處理。
8. 如申請專利範圍第 6 項至第 7 項中任一項之方法，其中該方法進一步包含使該式 I 化合物與己二酸反應以形

成己二酸鹽。

9. 如申請專利範圍第 6 項至第 7 項中任一項之方法，其中式 I、式 II、式 III 及式 IV 之該等化合物各自為游離鹼。

10. 如申請專利範圍第 6 項至第 7 項中任一項之方法，其中該方法進一步包含：

(a) 在回流下在甲醇中加熱該式 I 化合物以形成混合物；

(b) 在(a)之後，向該混合物中添加甲基異丁基酮；

(c) 在(b)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；

(d) 在(c)之後，向該濃縮混合物中添加甲醇以形成稀釋混合物；

(e) 在(d)之後，在回流下加熱該稀釋混合物以形成混合物；

(f) 在(e)之後，向該混合物中添加甲基異丁基酮；

(g) 在(f)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；

(h) 在(g)之後，向該濃縮混合物中添加己二酸及甲醇；

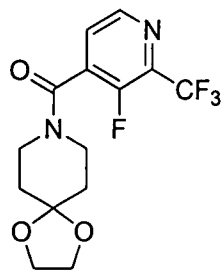
(i) 在(h)之後，在回流下加熱該混合物；及

(j) 在(i)之後，藉由在 40°C 至 50°C 之內部溫度下蒸餾來移除一部分溶劑以形成濃縮混合物；

(k) 在(j)之後，向該混合物中添加庚烷；及

(l) 在(k)之後，在室溫下攪拌該混合物以形成該式 I 化合物之該己二酸鹽。

11. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該式 IV 化合物或其鹽係藉由包含使式 V 化合物：



V

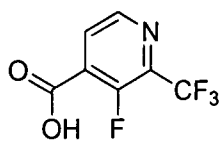
或其鹽脫保護之方法產生。

12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該脫保護包含與酸水溶液反應。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該酸為鹽酸。

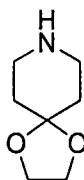
14. 如申請專利範圍第 11 項至第 13 項中任一項之方法，其中式 I、式 II、式 III、式 IV 及式 V 之該等化合物各自為游離鹼。

15. 如申請專利範圍第 11 項至第 13 項中任一項之方法，其中該式 V 化合物或其鹽係藉由包含使式 VI 化合物：



VI

與式 VII 化合物：

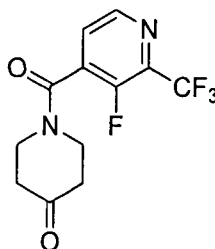


VII

在偶合劑存在下反應之方法產生。

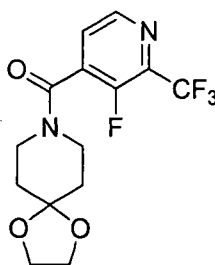
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該偶合劑為六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(二甲胺基)-磷(BOP)。

17. 一種製備式 IV 化合物：



IV

或其鹽之方法，其包含使式 V 化合物：



V

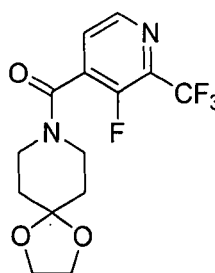
或其鹽脫保護以形成式 IV 化合物或其該鹽。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該脫保護包含與酸水溶液反應。

19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該酸為鹽酸。

20. 如申請專利範圍第 17 項至第 19 項中任一項之方法，其中式 IV 及式 V 之該等化合物各自為游離鹼。

21. 一種製備式 V 化合物：



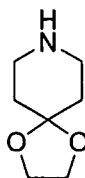
V

或其鹽之方法，其包含使式 VI 化合物：



VI

或其鹽與式 VII 化合物：

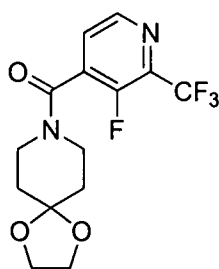


VII

或其鹽在偶合劑存在下反應以形成該式 V 化合物或其該鹽。

22. 如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該偶合劑為六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(二甲胺基)-磷(BOP)。

23. 一種式 V 化合物：



V

或其鹽。