



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104024256 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201280046561. 4

(22) 申请日 2012. 09. 06

(30) 优先权数据

61/531, 896 2011. 09. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/053921 2012. 09. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/036611 EN 2013. 03. 14

(73) 专利权人 因塞特控股公司

地址 美国德拉华州

(72) 发明人 周家成 刘平礼 G·曹 Y·吴

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有

限公司 11111

代理人 杨颖 张金芝

(51) Int. Cl.

C07D 487/04(2006. 01)

C07D 491/10(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20070191364 A1, 2007. 08. 16,

WO 2009114512 A1, 2009. 09. 17,

审查员 李莎莎

权利要求书5页 说明书29页

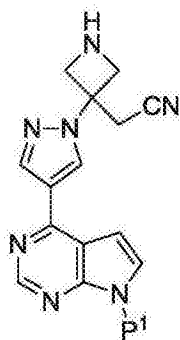
(54) 发明名称

用于制备 JAK 抑制剂的方法和中间体

(57) 摘要

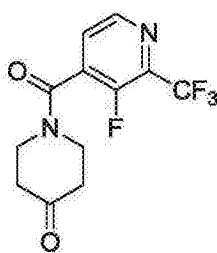
本发明涉及用于制备适用于治疗与詹纳斯 (Janus) 激酶 (JAK) 的活性相关的疾病 (包括炎症性病症、自身免疫性病症、癌症和其它疾病) 的 {1-[1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基} 乙腈的方法和中间体。

1. 一种方法,其包括使式 III 化合物:



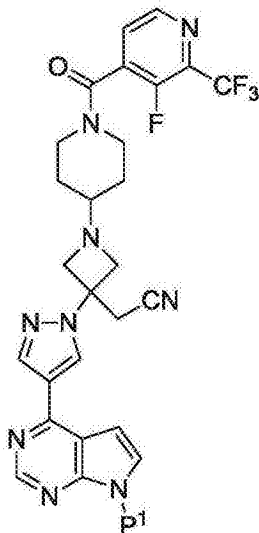
III

或其盐与式 IV 化合物:



IV

在还原剂存在下反应以形成式 II 化合物:



II

或其盐,其前提条件为所述还原剂不是氰基硼氢化钠;其中 P<sup>1</sup>为保护基。

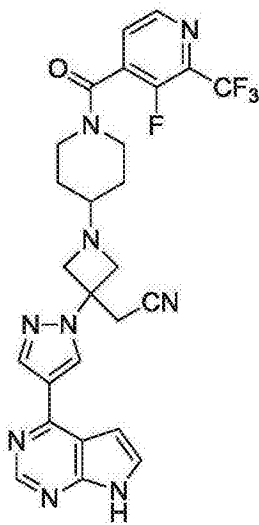
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述保护基为  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

3. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法,其中所述还原剂选自氰基硼氢化钠和三乙酰氧基硼氢化钠。

4. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法,其中所述还原剂为三乙酰氧基硼氢化钠。

5. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法,其中所述式 II 化合物、所述式 III 化合物和所述式 IV 化合物各自为游离碱。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其进一步包括使式 II 化合物或其所述盐脱保护以形成式 I 化合物:



I

或其盐。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述脱保护包括用三氟化硼醚合物处理,随后用氢氧化铵水溶液处理。

8. 如权利要求 6 至 7 中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述式 I 化合物与己二酸反应以形成己二酸盐。

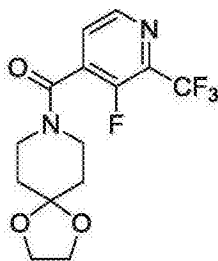
9. 如权利要求 6 至 7 中任一项所述的方法,其中所述式 I 化合物、所述式 II 化合物、所述式 III 化合物和所述式 IV 化合物各自为游离碱。

10. 如权利要求 6 至 7 中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括:

- (a) 在回流下在甲醇中加热所述式 I 化合物以形成混合物;
- (b) 在 (a) 之后,向所述混合物中添加甲基异丁基酮;
- (c) 在 (b) 之后,通过在 40°C 至 50°C 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;
- (d) 在 (c) 之后,向所述浓缩混合物中添加甲醇以形成稀释混合物;
- (e) 在 (d) 之后,在回流下加热所述稀释混合物以形成混合物;
- (f) 在 (e) 之后,向所述混合物中添加甲基异丁基酮;
- (g) 在 (f) 之后,通过在 40°C 至 50°C 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;
- (h) 在 (g) 之后,向所述浓缩混合物中添加己二酸和甲醇;
- (i) 在 (h) 之后,在回流下加热所述混合物;以及
- (j) 在 (i) 之后,通过在 40°C 至 50°C 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;
- (k) 在 (j) 之后,向所述混合物中添加庚烷;以及

(1) 在 (k) 之后, 在室温下搅拌所述混合物以形成所述式 I 化合物的所述己二酸盐。

11. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述式 IV 化合物或其盐通过包括使式 V 化合物:



V

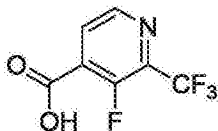
或其盐脱保护的方法产生。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中所述脱保护包括与酸的水溶液反应。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中所述酸为盐酸。

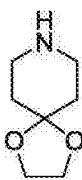
14. 如权利要求 11 至 13 中任一项所述的方法, 其中所述式 I 化合物、所述式 II 化合物、所述式 III 化合物、所述式 IV 化合物和所述式 V 化合物各自为游离碱。

15. 如权利要求 11 至 13 中任一项所述的方法, 其中所述式 V 化合物或其盐通过包括使式 VI 化合物:



VI

与式 VII 化合物:

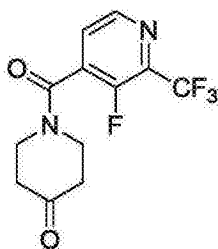


VII

在偶联剂存在下反应的方法产生。

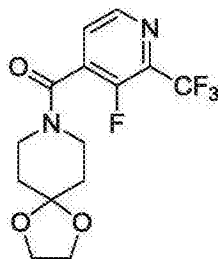
16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中所述偶联剂为六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-三(二甲氨基)-膦 (BOP)。

17. 一种制备式 IV 化合物:



IV

或其盐的方法,其包括使式 V 化合物:



V

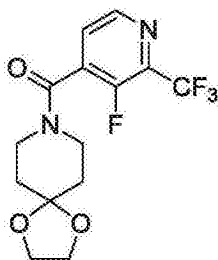
或其盐脱保护以形成式 IV 化合物或其所述盐。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述脱保护包括与酸的水溶液反应。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述酸为盐酸。

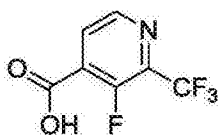
20. 如权利要求 17 至 19 中任一项所述的方法,其中所述式 IV 化合物和所述式 V 化合物各自为游离碱。

21. 一种制备式 V 化合物:



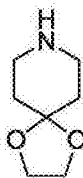
V

或其盐的方法,其包括使式 VI 化合物:



VI

或其盐与式 VII 化合物:

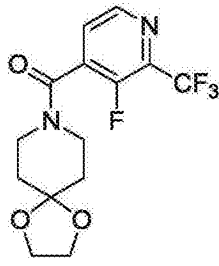


VII

或其盐在偶联剂存在下反应以形成所述式 V 化合物或其所述盐。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述偶联剂为六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-三(二甲氨基)-膦 (BOP)。

23. 一种式 V 化合物：



V

或其盐。

## 用于制备 JAK 抑制剂的方法和中间体

[0001] 本申请要求在 2011 年 9 月 7 日提交的美国临时申请 61/531,896 的优先权,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于制备适用于治疗与詹纳斯激酶 (JAK) 的活性相关的疾病 (包括炎症性疾病、自身免疫性疾病、癌症和其它疾病) 的 {1-[1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]咪啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈的方法和中间体。

### [0003] 背景

[0004] 蛋白激酶 (PK) 调控不同生物过程,尤其包括细胞生长、存活、分化、器官形成、形态发生、新血管形成、组织修复和再生。蛋白激酶还在许多人类疾病 (包括癌症) 中起特别作用。细胞因子、低分子量多肽或糖蛋白调控宿主对败血症的炎症性反应中涉及的许多途径。细胞因子影响细胞分化、增殖和活化,并且可以调节促炎症性反应和抗炎性反应以允许宿主对病原体做出适当反应。广泛范围的细胞因子的信号传导涉及蛋白酪氨酸激酶的詹纳斯激酶家族 (JAK) 以及信号转导和转录活化因子 (Signal Transducers and Activators of Transcription; STAT)。存在四种已知哺乳动物的 JAK: JAK1 (詹纳斯激酶-1)、JAK2、JAK3 (也称为白细胞詹纳斯激酶; JAKL; 和 L-JAK) 和 TYK2 (蛋白-酪氨酸激酶 2)。

[0005] 细胞因子刺激的免疫和炎症性反应有助于疾病的发病机制: 如重度联合免疫缺陷 (SCID) 的病理学起因于免疫系统受遏制, 而活性过高或不当的免疫 / 炎症性反应有助于自身免疫性疾病 (例如哮喘、全身性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus)、甲状腺炎、心肌炎) 以及如硬皮病和骨关节炎的疾病的病理学 (Ortmann, R. A., T. Cheng 等 (2000) *Arthritis Res*2(1):16-32)。

[0006] JAK 的表达缺陷与许多疾病病况相关。例如, *Jak1*<sup>-/-</sup> 小鼠在出生时矮小、无法照料并且在围产期死亡 (Rodig, S. J., M. A. Meraz 等 (1998) *Cell*93(3):373-83)。*Jak2*<sup>-/-</sup> 小鼠胚胎贫血并且由于不存在决定性的红细胞生成而在交配后约第 12.5 天死亡。

[0007] 据信 JAK/STAT 途径并且具体来说所有四种 JAK 在哮喘反应、慢性阻塞性肺病、支气管炎和下呼吸道的其它相关炎症性疾病的发病机制中起作用。已发现通过 JAK 传导信号的多种细胞因子与上呼吸道的炎症性疾病 / 病状 (如影响鼻和窦的那些 (例如鼻炎和鼻窦炎)) 相关联, 无论其是否为典型过敏性反应。也已发现 JAK/STAT 途径牵涉到眼部的炎症性疾病 / 病状和慢性过敏性反应。

[0008] 癌症中 JAK/STAT 的活化可由于细胞因子刺激 (例如 IL-6 或 GM-CSF) 或内源性 JAK 信号传导遏制物 (如 SOCS (细胞因子信号传导遏制物) 或 PIAS (活化 STAT 蛋白抑制剂)) 的减少而发生 (Boudny, V. 和 Kovarik, J., *Neoplasms*. 49:349-355, 2002)。STAT 信号传导以及 JAK 下游的其它途径 (例如 Akt) 的活化已与许多癌症类型中的不良预后相关联 (Bowman, T. 等 *Oncogene*19:2474-2488, 2000)。通过 JAK/STAT 传导信号的循环细胞因子的水平升高在恶病质 (cachexia) 和 / 或慢性疲劳中起病因性作用。因此, JAK 抑制可因延及

潜在抗肿瘤活性以外的原因而有益于癌症患者。

[0009] JAK2 酪氨酸激酶可以有益于患有骨髓增生性病症的患者,所述病症例如真性红细胞增多症 (polycythemia vera, PV)、特发性血小板增多症 (essential thrombocythemia, ET)、伴有骨髓纤维化的骨髓化生 (myeloid metaplasia with myelofibrosis, MMM) (Levin 等, *Cancer Cell*, 第 7 卷, 2005:387-397)。抑制 JAK2V617F 激酶会减少造血细胞的增殖,表明 JAK2 为用于在患有 PV、ET 和 MMM 的患者中进行药理学抑制的潜在目标。

[0010] 抑制 JAK 可有益于罹患皮肤免疫病症(如牛皮癣和皮肤致敏)的患者。据信除各种趋化因子和生长因子之外,牛皮癣的维持还取决于许多炎症性细胞因子 (JCI, 113:1664-1675), 其中许多炎症性细胞因子通过 JAK 传导信号 (*Adv Pharmacol.* 2000;47:113-74)。

[0011] JAK1 在当调控异常时可以导致或促成疾病病况的许多细胞因子和生长因子信号传导途径中起主要作用。例如,在类风湿性关节炎(已表明 IL-6 在其中具有不利影响的疾病)中, IL-6 水平升高 (Fonesca, J.E. 等, *Autoimmunity Reviews*, 8:538-42, 2009)。因为 IL-6 至少部分通过 JAK1 传导信号,所以预期通过 JAK1 抑制直接或间接拮抗 IL-6 会提供临床益处 (Guschin, D., N. 等 *Embo J*14:1421, 1995; Smolen, J. S. 等 *Lancet*371:987, 2008)。此外,在一些癌症中, JAK1 突变,从而导致不良的组成型肿瘤细胞生长和存活 (Mullighan CG, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:9414-8, 2009; Flex E. 等 *J Exp Med.* 205:751-8, 2008)。在其它自身免疫性疾病和癌症中,活化 JAK1 的炎症性细胞因子的全身性水平升高也可促成疾病和/或相关症状。因此,患有所述疾病的患者可受益于 JAK1 抑制。JAK1 的选择性抑制剂可为有效的,同时避免抑制其它 JAK 激酶的不必要和可能不良作用。

[0012] 相对于其它 JAK 激酶, JAK1 的选择性抑制剂可具有优于选择性较低的抑制剂的多种治疗优势。关于针对 JAK2 的选择性,许多重要细胞因子和生长因子通过 JAK2 传导信号,包括(例如)红细胞生成素 (erythropoietin, Epo) 和血小板生成素 (thrombopoietin, Tpo) (Parganas E 等 *Cell.* 93:385-95, 1998)。Epo 为红细胞产生的关键生长因子;因此缺乏 Epo 依赖性信号传导可以导致红细胞数量减少和贫血 (Kaushansky K, *NEJM*354:2034-45, 2006)。作为 JAK2 依赖性生长因子的另一个实例, Tpo 在控制巨核细胞(自其产生血小板的细胞)的增殖和成熟中起主要作用 (Kaushansky K, *NEJM*354:2034-45, 2006)。因此, Tpo 信号传导降低将使巨核细胞数减少(巨核细胞减少症 (megakaryocytopenia)) 和循环血小板计数降低(血小板减少症 (thrombocytopenia))。此可导致不良和/或不可控制的出血。对如 JAK3 和 Tyk2 的其它 JAK 的抑制降低也可能合乎需要,因为缺乏这些激酶的功能性型式的人已显示罹患众多疾病,如重度联合免疫缺陷或高免疫球蛋白 E 综合征 (Minegishi, Y 等 *Immunity*25:745-55, 2006; Macchi P 等 *Nature.* 377:65-8, 1995)。因此,就涉及免疫遏制、贫血和血小板减少症的副作用减少来说,对其它 JAK 的亲和力降低的 JAK1 抑制剂将具有优于选择性较低的抑制剂的显著优势。

[0013] 由于 JAK 抑制剂的适用性,需要开发用于制备 JAK 抑制剂的新方法。本发明针对此需要和其它需要。

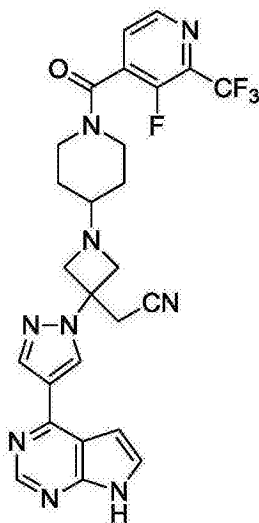
[0014] 概述

[0015] 在于 2011 年 3 月 9 日提交的美国序列号 13/043, 986(其以引用的方式整体



并入本文) 中描述 JAK 抑制剂, 其包括 {1-{1-[3- 氟 -2-( 三氟甲基) 异烟酰基] 哌啶-4-基}-3-[4-(7H- 吡咯并 [2, 3-d] 嘧啶-4-基)-1H- 吡唑-1-基] 氮杂环丁烷-3-基} 乙腈, 其在下文描绘为式 I。

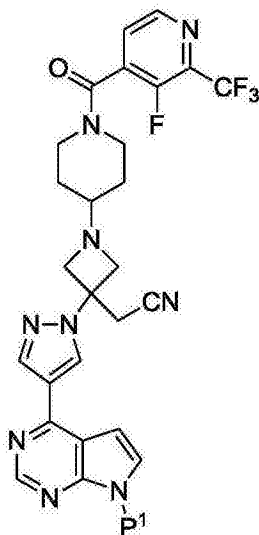
[0016]



I

[0017] 本发明尤其提供用于制备式 I 化合物的方法和中间体。具体来说, 本发明提供制备式 II 化合物:

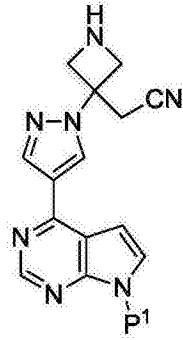
[0018]



II

[0019] 或其盐的方法, 其包括使式 III 化合物:

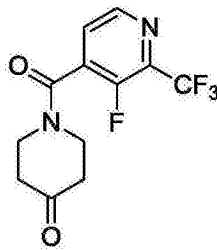
[0020]



III

[0021] 或其盐与式 IV 化合物：

[0022]

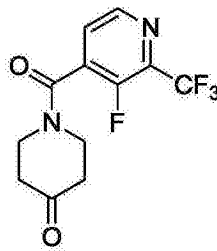


IV

[0023] 或其盐在还原剂存在下反应,以形成式 II 化合物或其所述盐,其前提条件为所述还原剂不是氰基硼氘化钠;其中 P¹为保护基。

[0024] 本发明还提供制备式 IV 化合物：

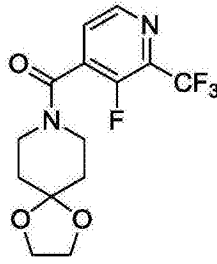
[0025]



IV

[0026] 或其盐的方法,其包括使式 V 化合物：

[0027]

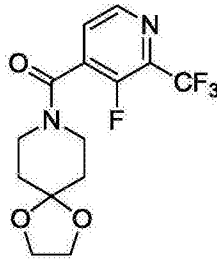


V

[0028] 或其盐脱保护以形成式 IV 化合物或其所述盐。

[0029] 本发明提供制备式 V 化合物：

[0030]



V

[0031] 或其盐的方法,其包括使式 VI 化合物：

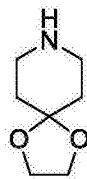
[0032]



VI

[0033] 或其盐与式 VII 化合物：

[0034]

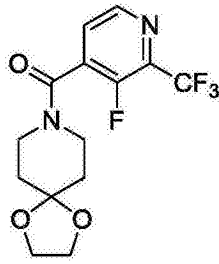


VII

[0035] 在偶联剂存在下反应以形成式 V 化合物或其所述盐。

[0036] 本发明进一步提供式 V 化合物：

[0037]



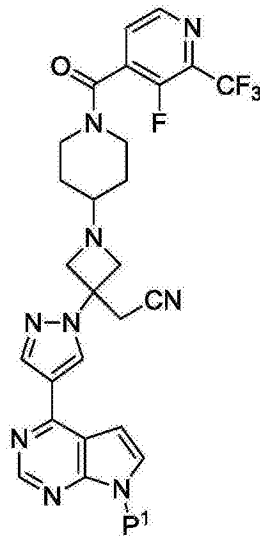
V

[0038] 或其盐。

[0039] 详述

[0040] 本发明提供一种制备式 II 化合物：

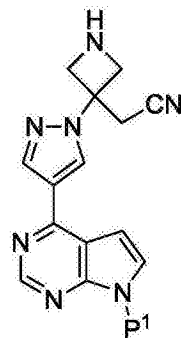
[0041]



II

[0042] 或其盐的方法,其包括使式 III 化合物：

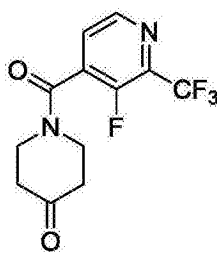
[0043]



III

[0044] 或其盐与式 IV 化合物：

[0045]



## IV

[0046] 或其盐在还原剂存在下反应以形成式 II 化合物或其所述盐,其前提条件为所述还原剂不是氰基硼氢化钠;其中 P<sup>1</sup>为保护基。

[0047] 在一些实施方案中,式 III 和式 IV 化合物优选以游离碱形式使用,并且式 II 化合物优选以游离碱形式产生。如本文所用,“游离碱”是指化合物的非盐形式。

[0048] 在一些实施方案中,在叔胺(例如三乙胺)存在下进行化合物 III 与化合物 IV 的反应。在一些实施方案中,反应温度 ≤ 30°C。在一些实施方案中,反应在适合溶剂中进行。在一些实施方案中,适合溶剂为二氯甲烷。

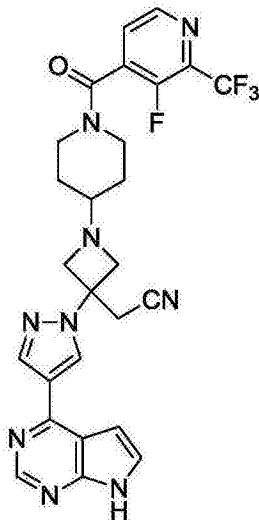
[0049] 适当 P<sup>1</sup>保护基包括(但不限于)Wuts 和 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley & Sons: New Jersey, 第 696-887 页(并且具体来说第 872-887 页)(2007) 中描述的胺保护基,所述文献以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中, P<sup>1</sup>为苄氧羰基(Cbz)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、2-(三甲基硅烷基)乙氧羰基(Teoc)、2-(4-三氟甲基苯磺酰基)乙氧羰基(Tsc)、叔丁氧羰基(BOC)、1-金刚烷基氧羰基(Adoc)、2-金刚烷基羰基(2-Adoc)、2,4-二甲基戊-3-基氧羰基(Doc)、环己氧羰基(Hoc)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙氧羰基(TcBOC)、乙烯基、2-氯乙基、2-苯磺酰基乙基、烯丙基、苄基、2-硝基苄基、4-硝基苄基、二苯基-4-吡啶基甲基、N',N'-二甲基胍基、甲氧基甲基、叔丁氧基甲基(Bom)、苄氧甲基(BOM)、2-四氢吡喃基(THP)、三(C<sub>1-4</sub>烷基)硅烷基(例如三(异丙基)硅烷基)、1,1-二乙氧基甲基、-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(SEM) 或 N-特戊酰基氧基甲基(POM)。在一些实施方案中, P<sup>1</sup>为 -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>。

[0050] 还原剂可以是适合在还原性胺化中使用的任何还原剂,包括各种硼氢化物和硼烷还原剂,如 Ellen W. Baxter 和 Allen B. Reitz, *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents*, *Organic Reactions*, 第 1 章, 第 1-57 页(Wiley, 2002) 中的还原剂,所述文献以引用的方式整体并入本文。适当还原剂的非限制性类别包括硼氢化物、氰基硼氢化物、三(C<sub>1-4</sub>烷基)氧基硼氢化物(例如三乙酰氧基硼氢化物衍生物)、9-硼二环[3.3.1]壬烷氢化物、三(C<sub>1-4</sub>烷基)硼氢化物以及二异松蒎基氰基硼氢化物衍生物、氨基硼烷、硼烷-吡啶络合物和烷基胺硼烷。适当还原剂的非限制性实例包括氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、氰基-9-硼二环[3.3.1]壬烷氢化钠、氰基硼氢化四丁铵、位于固体支撑物上的氰基硼氢化物、三乙酰氧基硼氢化四甲铵、三乙酰氧基硼氢化钠、三乙基硼氢化锂、三(仲丁基)硼氢化锂、二异松蒎基氰基硼氢化钠、儿茶酚硼烷、硼烷四氢呋喃、硼氢化钠、硼氢化钾、硼氢化锂、在氢气存在下的钪、5-乙基-2-甲基吡啶硼烷(PEMB)、2-甲基吡啶硼烷或聚合物支撑的三乙酰氧基硼氢化物。在一些实施方案中,任何以上所提到的并且优选氰基硼氢化钠与钛(IV) 添加剂、脱水剂或卤化锌添加剂组

合使用。在一些实施方案中,还原剂为氰基硼氢化四(C<sub>1-4</sub>烷基)铵或三乙酰氧基硼氢化四(C<sub>1-4</sub>烷基)铵、碱金属氰基硼氢化物或碱金属三乙酰氧基硼氢化物,或碱土氰基硼氢化物或碱土三乙酰氧基硼氢化物。在一些实施方案中,还原剂为碱金属氰基硼氢化物。在一些实施方案中,还原剂选自氰基硼氢化钠和三乙酰氧基硼氢化钠。在一些实施方案中,还原剂为三乙酰氧基硼氢化钠。如本文所用,钛(IV)添加剂为含有钛(IV)金属的路易斯酸(Lewis acid)(例如四氯化钛、异丙醇钛、乙醇钛及类似物)。

[0051] 在一些实施方案中,方法进一步包括使式 II 化合物或其所述盐脱保护,以形成式 I 化合物:

[0052]



[0053]

I

[0054] 或其盐。

[0055] 在一些实施方案中,式 I 化合物最初以游离碱形式由式 II 化合物的游离碱形式产生。

[0056] 在一些实施方案中,脱保护涉及使式 II 化合物与适合脱保护剂反应。在一些实施方案中,脱保护包括用三氟化硼醚合物处理,随后用氢氧化铵水溶液处理。在一些实施方案中,在 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 或 $\leq 5^{\circ}\text{C}$ 的温度下,在适合溶剂中进行脱保护。在一些实施方案中,适合溶剂为乙腈。

[0057] 在一些实施方案中,使式 II 化合物脱保护以形成式 I 化合物的方法进一步包括使式 I 化合物与己二酸反应以形成己二酸盐。

[0058] 在一些实施方案中,方法进一步包括:

[0059] (a) 在回流下在甲醇中加热式 I 化合物以形成混合物;

[0060] (b) 在(a)之后,向混合物中添加甲基异丁基酮;

[0061] (c) 在(b)之后,通过在 $40^{\circ}\text{C}$ 至 $50^{\circ}\text{C}$ 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;

[0062] (d) 在(c)之后,向浓缩混合物中添加甲醇以形成稀释混合物;

[0063] (e) 在(d)之后,在回流下加热稀释混合物以形成混合物;

[0064] (f) 在(e)之后,向混合物中添加甲基异丁基酮;

[0065] (g) 在 (f) 之后,通过在 40°C 至 50°C 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;

[0066] (h) 在 (g) 之后,向浓缩混合物中添加己二酸和甲醇;

[0067] (i) 在 (h) 之后,在回流下加热混合物;以及

[0068] (j) 在 (i) 之后,通过在 40°C 至 50°C 的内部温度下蒸馏来移除一部分溶剂以形成浓缩混合物;

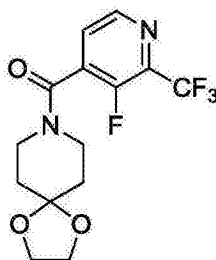
[0069] (k) 在 (j) 之后,向混合物中添加庚烷;以及

[0070] (l) 在 (k) 之后,在室温下搅拌混合物以形成式 I 化合物的己二酸盐。

[0071] 处理式 II 化合物以移除 P<sup>1</sup> 基团可以通过本领域中已知用于移除特定胺保护基的方法达成,所述方法如 Wuts 和 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley&Sons: New Jersey, 第 696-887 页 (并且具体来说第 872-887 页) (2007) 中的方法,所述文献以引用的方式整体并入本文。例如,在一些实施方案中,通过用氟化物离子 (例如用氟化四丁铵处理)、盐酸、对甲苯磺酸吡啶 (PPTS) 或路易斯酸 (例如四氟硼酸锂) 处理来移除 P<sup>1</sup> 基团。在一些实施方案中,处理包括用四氟硼酸锂处理,随后用氢氧化铵处理 (例如当 P<sup>1</sup> 为 2-(三甲基硅烷基)乙氧基甲基时)。在一些实施方案中,处理包括用碱处理 (例如 P<sup>1</sup> 为 N-特戊酰基氧基甲基)。在一些实施方案中,碱为碱金属氢氧化物。在一些实施方案中,碱为氢氧化钠。在一些实施方案中,处理包括用氢氧化钠或氨在如甲醇或水的溶剂中处理。

[0072] 在一些实施方案中,式 IV 化合物或其盐通过包括使式 V 化合物:

[0073]



V

[0074] 或其盐脱保护的方法产生。

[0075] 在一些实施方案中,式 V 化合物优选以游离碱形式使用,并且式 IV 化合物优选以游离碱形式产生。

[0076] 在一些实施方案中,脱保护包括与酸的水溶液反应。

[0077] 在一些实施方案中,酸为盐酸。

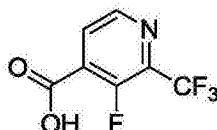
[0078] 在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量 5、6、7、8、9 或 10 当量的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量 6、7、8、9 或 10 当量或以上的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量 7、8、9 或 10 当量或以上的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量 8、9 或 10 当量或以上的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式 V 化合物过量 9 或 10 当量或以上的酸的水溶液。在一些实施方案中,使用相对于式

V 化合物过量 9 当量或以上的酸的水溶液。在一些实施方案中,在  $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 10^{\circ}\text{C}$  或  $\leq 5^{\circ}\text{C}$  的温度下,在乙腈溶剂中进行脱保护。

[0079] 其它适当脱保护条件包括(但不限于)Wuts 和 Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 4 版, John Wiley&Sons: New Jersey, 第 696-887 页(并且具体来说是第 872-887 页)(2007) 中的条件,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0080] 在一些实施方案中,式 V 化合物通过包括使式 VI 化合物:

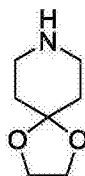
[0081]



VI

[0082] 或其盐与式 VII 化合物:

[0083]



VII

[0084] 或其盐在偶联剂存在下反应的方法产生。

[0085] 适当偶联剂为用于使胺与酸偶联以形成胺的任何熟知偶联剂。非限制性实例包括碳化二亚胺类(例如 N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳化二亚胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基或二甲氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDC 盐酸盐)或碳化二亚胺(EDC)或 1,1'-羰基二咪唑(CDI))、在 1-羟基苯并三唑(HOBt)或其水合物存在下的碳化二亚胺试剂、膦基偶联剂(例如六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-三(二甲氨基)-膦(BOP)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基膦(PyBOP)、六氟磷酸(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)-三-吡咯烷基膦(PyAOP)、六氟磷酸溴三吡咯烷基膦(PyBrOP)、双(2-氧代-3-唑烷基)次膦酰氯(BOP-Cl))、铵基试剂(例如六氟磷酸 O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(HBTU)、四氟硼酸 O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(TBTU)、3-(二乙基磷酰基氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT)、六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(HATU)、六氟磷酸 O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(HCTU)和四氟硼酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(TATU))、脒基试剂(四氟硼酸 O-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺基)-N,N,N',N'-四甲基脒(TNTU)和四氟硼酸 O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基脒(TSTU)、四氟硼酸 O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脒(TDBTU)、四氟硼酸 O-(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)-N,N,N',N'-四甲基脒(TPTU)或四氟硼酸 O-[(乙氧羰基)氰基-亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脒(TOTU))、其它试剂,包括(但不限于)3-(二乙基磷酰基氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT)、羰基





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、 $\alpha, \alpha, \alpha$ -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、其混合物及类似物。

[0097] 适合醚溶剂包括：二甲氧基甲烷、四氢呋喃、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、叔丁基甲基醚、其混合物及类似物。

[0098] 适合质子溶剂可以包括例如（并且不限制）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、异丁醇、叔丁醇、2-乙氧基乙醇、二乙二醇、1-戊醇、2-戊醇或3-戊醇、新戊醇、叔戊醇、二乙二醇单甲醚、二乙二醇单乙醚、环己醇、苯甲醇、苯酚或甘油。

[0099] 适合非质子溶剂可以包括例如（并且不限制）四氢呋喃（THF）、N, N-二甲基甲酰胺（DMF）、N, N-二甲基乙酰胺（DMA）、1, 3-二甲基-3, 4, 5, 6-四氢-2(1H)-嘧啶酮（DMPU）、1, 3-二甲基-2-咪唑烷酮（DMI）、N-甲基吡咯烷酮（NMP）、甲酰胺、N-甲基乙酰胺、N-甲基甲酰胺、乙腈、二甲亚砜、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、环丁砜、N, N-二甲基丙酰胺、四甲基脲、硝基甲烷、硝基苯或六甲基磷酰胺。

[0100] 适合烃溶剂包括苯、环己烷、戊烷、己烷、甲苯、环庚烷、甲基环己烷、庚烷、乙苯、间二甲苯、邻二甲苯或对二甲苯、辛烷、二氢化茚、壬烷或萘。

[0101] 本文所述方法的反应可以在可以易于由熟练技术人员确定的适当温度下进行。反应温度将取决于（例如）试剂和溶剂（如果存在）的熔点和沸点、反应的热力学（例如剧烈放热反应可能需要在低温下进行）以及反应的动力学（例如高活化能势垒可能需要高温）。“高温”是指高于室温（约 22°C）的温度。

[0102] 本文所述方法的反应可以在空气中或在惰性氛围下进行。通常，含有实质上与空气反应的试剂或产物的反应可以使用熟练技术人员熟知的空气敏感性合成技术进行。

[0103] 在一些实施方案中，化合物的制备可以涉及添加酸或碱，以影响（例如）对所要反应的催化作用或如酸加成盐的盐形式的形成。

[0104] 示例性酸可以是无机酸或有机酸。无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸。有机酸包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、苯甲酸、4-硝基苯甲酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、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、壬酸和癸酸。

[0105] 示例性碱包括氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸锂、碳酸钠和碳酸钾。一些示例性强碱包括（但不限于）氢氧化物、烷氧化物、金属酰胺、金属氢化物、金属二烷基酰胺和芳基胺，其中：烷氧化物包括甲基、乙基和叔丁基氧化物的锂盐、钠盐和钾盐；金属酰胺包括氨基钠、氨基钾和氨基锂；金属氢化物包括氢化钠、氢化钾和氢化锂；并且金属二烷基酰胺包括被甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、三甲基硅烷基和环己基取代的酰胺的钠盐和钾盐。

[0106] 中间体和产物也可包括本文公开的化合物的盐。如本文所用，术语“盐”指通过向本文公开的化合物中添加可接受的酸或碱所形成的盐。在一些实施方案中，盐为药学上可接受的盐。如本文所用，短语“药学上可接受的”指某一物质从毒理学观点来看可为在药学应用中使用所接受并且不会不利地与活性成分相互作用。药学上可接受的盐（包括单盐和双盐）包括（但不限于）由如（但不限于）以下的有机酸和无机酸获得的盐：乙

酸、乳酸、柠檬酸、肉桂酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、丙二酸、扁桃酸、苹果酸、草酸、丙酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、乙醇酸、丙酮酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、甲苯磺酸、水杨酸、苯甲酸和类似已知的可接受酸。适合盐的列表见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, 第 1418 页和 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2(1977) 中, 其各自以引用的方式整体并入本文。

[0107] 在根据本文所述的方法制备化合物后, 可使用常用分离和纯化操作, 如浓缩、过滤、萃取、固相萃取、再结晶、层析及类似操作来分离所要产物。

[0108] 在一些实施方案中, 本发明化合物及其盐大致上是分离的。就“大致上是分离的”来说, 其是指化合物至少部分或大致上从其形成或检测到时所处的环境分离。部分分离可以包括(例如)富含本发明化合物的组合物。大致上分离可以包括含有至少约 50 重量%、至少约 60 重量%、至少约 70 重量%、至少约 80 重量%、至少约 90 重量%、至少约 95 重量%、至少约 97 重量%或至少约 99 重量%的本发明化合物或其盐的组合物。分离化合物及其盐的方法在本领域中是常规的。

[0109] 用途

[0110] 式 I 化合物 {1-[1-[3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基]哌啶-4-基]-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈为 JAK(例如 JAK1、JAK2)的抑制剂。JAK 抑制剂适用于治疗各种 JAK 相关性疾病或病症。JAK 相关性疾病的实例包括涉及免疫系统的疾病, 包括(例如)器官移植排斥(例如同种异体移植排斥和移植排斥抗宿主疾病)。JAK 相关性疾病的其它实例包括自身免疫性疾病, 如多发性硬化症、类风湿性关节炎、青少年关节炎、牛皮癣性关节炎、I 型糖尿病、狼疮、牛皮癣、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、重症肌无力、免疫球蛋白性肾病、心肌炎、自身免疫性甲状腺病症、慢性阻塞性肺病(COPD)以及类似疾病。在一些实施方案中, 自身免疫性疾病为自身免疫性大疱性皮肤病, 如寻常天疱疮(pemphigus vulgaris, PV)或大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid, BP)。

[0111] JAK 相关性疾病的其它实例包括过敏性病状, 如哮喘、食物过敏、湿疹性皮炎、接触性皮炎、异位性皮炎(异位性湿疹)和鼻炎。JAK 相关性疾病的其它实例包括病毒性疾病, 如艾伯斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus, EBV)、B 型肝炎、C 型肝炎、HIV、HTLV1、水痘-带状疱疹病毒(Varicella-Zoster Virus, VZV)和人乳头状瘤病毒(Human Papilloma Virus, HPV)。

[0112] JAK 相关性疾病的其它实例包括与软骨转换(cartilage turnover)相关的疾病, 例如痛风性关节炎、败血性或感染性关节炎、反应性关节炎、反射交感性营养不良(reflex sympathetic dystrophy)、痛性营养不良(algodystrophy)、泰齐综合征(Tietze syndrome)、肋骨关节病、地方性变形性骨关节炎(osteoarthritis deformans endemica)、姆塞莱尼病(Mseleni disease)、汉迪格度病(Handigodu disease)、由纤维肌痛引起的退化、全身性红斑狼疮、硬皮病或强直性脊柱炎。

[0113] JAK 相关性疾病的其它实例包括先天性软骨畸形, 包括遗传性软骨溶解(hereditary chondrolysis)、软骨发育不良(chondrodysplasias)和假性软骨发育不良(pseudochondrodysplasias)(例如小耳症(microtia)、无耳(enotia)和干骺端软骨发育不良(metaphyseal chondrodysplasia))。

[0114] JAK 相关性疾病或病状的其它实例包括皮肤病症,如牛皮癣(例如寻常性牛皮癣(psoriasis vulgaris))、异位性皮炎、皮疹、皮肤刺激、皮肤致敏(例如接触性皮炎或过敏性接触性皮炎)。例如,当局部应用时,包括一些药品的某些物质可以引起皮肤致敏。在一些实施方案中,共施用或依序施用至少一种本发明 JAK 抑制剂以及引起不当致敏的药剂可以有助于治疗所述不当致敏或皮炎。在一些实施方案中,通过局部施用至少一种本发明 JAK 抑制剂来治疗皮肤病症。

[0115] JAK 相关性疾病或病状的其它实例包括特征在于以下的疾病或病状:实体肿瘤(例如前列腺癌、肾癌、肝癌、胰脏癌、胃癌、乳癌、肺癌、头颈癌、甲状腺癌、成胶质细胞瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、卡斯尔曼氏病(Castleman's disease)、子宫平滑肌肉瘤、黑素瘤(melanoma)等)、血液癌症(例如淋巴瘤、白血病(如急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML))或多发性骨髓瘤)和皮肤癌(如皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)和皮肤 B 细胞淋巴瘤)。示例性 CTCL 包括塞扎莱综合征(Sezary syndrome)和蕈样真菌病(mycosis fungoides)。JAK 相关性疾病或病状的其它实例包括肺动脉高血压。

[0116] JAK 相关性疾病或病状的其它实例包括炎症相关性癌症。在一些实施方案中,癌症与炎症性肠病相关。在一些实施方案中,炎症性肠病为溃疡性结肠炎。在一些实施方案中,炎症性肠病为克罗恩氏病。在一些实施方案中,炎症相关性癌症为结肠炎相关性癌症。在一些实施方案中,炎症相关性癌症为结肠癌或结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症为胃癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤(GIST)、腺癌、小肠癌或直肠癌。

[0117] JAK 相关性疾病可以进一步包括特征在于表达以下的疾病:JAK2 突变体,如在伪激酶结构域中具有至少一个突变的突变体(例如 JAK2V617F);在伪激酶结构域以外具有至少一个突变的 JAK2 突变体;JAK1 突变体;JAK3 突变体;红细胞生成素受体(EPOR)突变体;或 CRLF2 的表达失调。

[0118] JAK 相关性疾病可以进一步包括骨髓增生性病征(MPD),如真性红细胞增多症(PV)、特发性血小板增多症(ET)、伴有骨髓化生的骨髓纤维化(MMM)、原发性骨髓纤维化(PMF)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、嗜酸细胞增多综合征(hypereosinophilic syndrome, HES)、全身性肥大细胞病(SMCD)以及类似疾病。在一些实施方案中,骨髓增生性病征为骨髓纤维化(例如原发性骨髓纤维化(PMF)或真性红细胞增多症/特发性血小板增多症后骨髓纤维化(PV 后/ET 后 MF))。在一些实施方案中,骨髓增生性病征为特发性血小板增多症后骨髓纤维化(ET 后 MF)。在一些实施方案中,骨髓增生性病征为真性红细胞增多症后骨髓纤维化(PV 后 MF)。

[0119] JAK 相关性疾病或病状的其它实例包括通过施用本发明化合物来改善其它药品的皮肤学副作用。例如,众多药物制剂会导致可以表现为痤疮样皮疹或相关皮炎的不当过敏反应。具有所述不良副作用的示例性药物制剂包括抗癌药物,如吉非替尼(gefitinib)、西妥昔单抗(cetuximab)、埃罗替尼(erlotinib)以及类似物。本发明化合物可以与具有不良皮肤学副作用的药物制剂组合(例如同时或依序)来全身性或局部(例如定位于皮炎附近)施用。在一些实施方案中,本发明化合物可以连同一种或多种其它药品一起局部施用,其中所述其它药品在不存在本发明化合物下局部应用时会导致接触性皮炎、过敏性接触致敏或类似皮肤病症。因此,本发明组合物包括含有本发明化合物和会引起皮炎、皮肤病症或相关副作用的另一药物制剂的局部调配物。

[0120] 其它 JAK 相关性疾病包括炎症和炎症性疾病。示例性炎症性疾病包括类肉瘤病、眼部炎症性疾病（例如虹膜炎、葡萄膜炎、巩膜炎、结膜炎或相关疾病）、呼吸道炎症性疾病（例如上呼吸道（包括鼻和窦）炎症性疾病，如鼻炎或鼻窦炎；或下呼吸道炎症性疾病，包括支气管炎、慢性阻塞性肺病以及类似疾病）、炎症性肌病（如心肌炎）和其它炎症性疾病。在一些实施方案中，眼部炎症性疾病为眼睑炎。

[0121] 其它 JAK 相关性疾病包括缺血再灌注损伤或与炎症性缺血事件（如中风或心跳骤停）相关的疾病或病状；内毒素驱动的疾病病况（例如旁路手术之后的并发症或造成慢性心脏衰竭的慢性内毒素状态）；如由癌症引起或与癌症相关的厌食、恶病质、疲劳；再狭窄；硬化性皮炎（sclerodermitis）；纤维化；与低氧或星形细胞胶质化（astrogliosis）相关的病状，例如像糖尿病性视网膜病变、癌症或神经退化；以及其它炎症性疾病，如全身性炎症性反应综合征（SIRS）和败血性休克。

[0122] 其它 JAK 相关性疾病包括痛风和由于例如良性前列腺肥大（benign prostatic hypertrophy）或良性前列腺增生（benign prostatic hyperplasia）造成的前列腺尺寸增加；以及骨再吸收疾病，如骨质疏松症或骨关节炎；与以下相关的骨再吸收疾病：激素不平衡和 / 或激素疗法、自身免疫性疾病（例如骨类肉瘤病）或癌症（例如骨髓瘤）。

[0123] 其它 JAK 相关性疾病包括干眼病症。如本文所用，“干眼病症”意图涵盖干眼症工作组（Dry Eye Workshop, DEWS）的最近官方报道中概述的疾病病况，所述报道将干眼症定义为“一种眼泪和眼表面的多因素疾病，其导致不适、视力障碍和泪膜不稳定症状，并且对眼表面具有潜在损害。其伴有泪膜的摩尔渗透压增加和眼表面炎症。”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，其以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中，干眼病症选自水性泪缺乏性干眼症（ADDE）或蒸发性干眼病症或其适当组合。在一些实施方案中，干眼病症为舍格伦综合征干眼症（Sjogren syndrome dry eye, SSDE）。在一些实施方案中，干眼病症为非舍格伦综合征干眼症（non-Sjogren syndrome dry eye, NSSDE）。

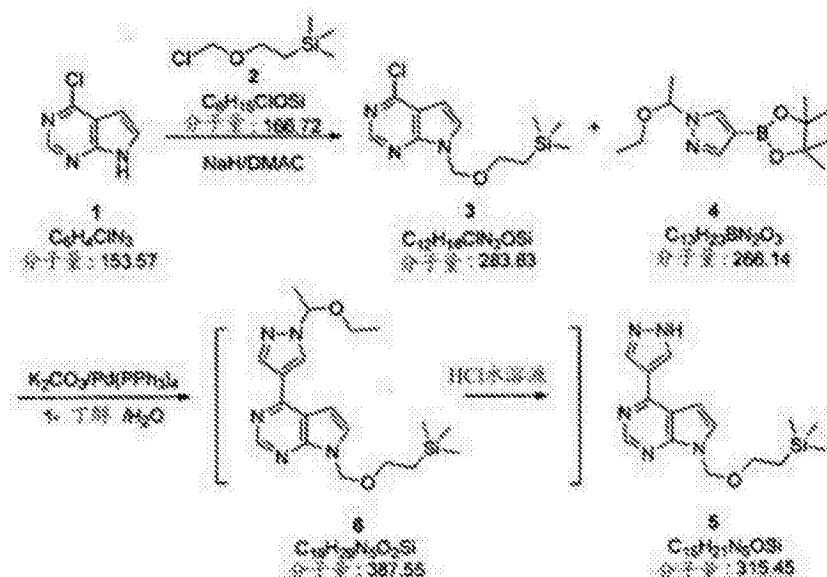
[0124] 其它 JAK 相关性疾病包括结膜炎、葡萄膜炎（包括慢性葡萄膜炎）、脉络膜炎、视网膜炎、睫状体炎、巩膜炎、上巩膜炎或虹膜炎。其它 JAK 相关性疾病包括与病毒感染相关的呼吸功能障碍或衰竭，如流行性感冒和 SARS。

## 实施例

[0125] 本发明将通过特定实施例更详细地描述。下列实施例是出于说明性目的而提供，并且不意图以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到可以进行改变或修改以产生基本上相同结果的多种非关键参数。

[0126] 实施例 1. 合成 4-(1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5)

[0127]



[0128] 步骤 1. 4-氯-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(3)

[0129] 在室温下向配备有氮气进口、加料漏斗、热电偶套管和机械搅拌器的烧瓶中添加 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(1,600g,3.91mol)和 N,N-二甲基乙酰胺(DMAC,9.6L)。混合物在冰/盐水浴中冷却至 0-5℃,随后在 0-5℃下分数份添加固体氢化钠(NaH,60wt%,174g,4.35mol,1.1当量)。反应混合物在 15 分钟之后变成深色溶液。接着以使内部反应温度不超过 5℃的速率经由加料漏斗缓慢添加三甲基硅烷基乙氧基甲基氯(2,SEM-Cl,763mL,4.31mol,1.1当量)。接着在 0-5℃下搅拌反应混合物 30 分钟。当通过 TLC 和 HPLC 所测定确定反应完成时,用水(1L)淬灭反应混合物。接着用水(12L)和甲基叔丁基醚(MTBE)(8L)稀释混合物。分离两个层并且水层用 MTBE(8L)萃取。合并的有机层用水(2x4L)和盐水(4L)洗涤并且溶剂转换成 1-丁醇。粗产物(3)在 1-丁醇中的溶液不经过进一步纯化即用于后续铃木(Suzuki)偶联反应中。或者,粗产物(3)的 MTBE 有机溶液用硫酸钠( $Na_2SO_4$ )干燥。在减压下移除溶剂。接着将残余物溶解在庚烷(2L)中,过滤并且装载到硅胶( $SiO_2$ ,3.5Kg)柱上,用庚烷(6L)、95%庚烷/乙酸乙酯(12L)、90%庚烷/乙酸乙酯(10L)和最终 80%庚烷/乙酸乙酯(10L)洗脱。合并含有所要纯产物的馏分并且在减压下浓缩得到呈浅黄色油状的 4-氯-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(3,987g,理论值 1109.8g,88.9%产率),其在室温下在静置时部分固化成油状固体。对于 3:<sup>1</sup>H NMR(DMSO- $d_6$ ,300MHz)  $\delta$  8.67(s,1H),7.87(d,1H,J=3.8Hz),6.71(d,1H,J=3.6Hz),5.63(s,2H),3.50(t,2H,J=7.9Hz),0.80(t,2H,J=8.1Hz),1.24(s,9H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(DMSO- $d_6$ ,100MHz)  $\delta$  151.3,150.8,150.7,131.5,116.9,99.3,72.9,65.8,17.1,-1.48ppm; $C_{12}H_{18}ClN_3OSi$ (MW283.83),LCMS(EI)m/e284/286( $M^+H$ )。

[0130] 步骤 2. 4-(1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(5)

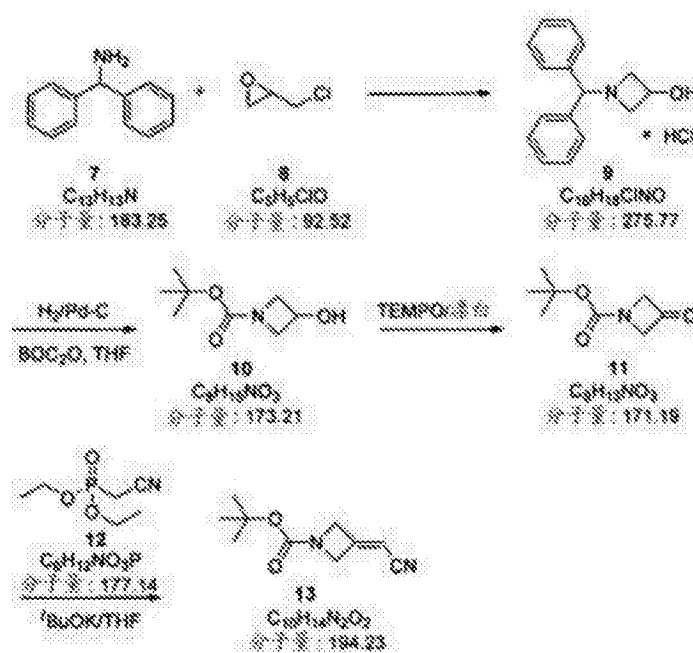
[0131] 在室温下向配备有顶置式搅拌器、冷凝器、热电偶套管和氮气进口的反应器中装入水( $H_2O$ ,9.0L)、固体碳酸钾( $K_2CO_3$ ,4461g,32.28mol,2.42当量)、4-氯-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(3,3597g,12.67mol)、1-(1-乙氧基乙基)-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼戊环-2-基)-1H-吡唑(4,3550g,13.34mol,

1.05 当量) 和 1-丁醇 (27L)。将所得反应混合物脱气三次,每次用氮气回填,随后在室温下用四(三苯膦)钯(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , 46g, 0.040mol, 0.003 当量) 处理。加热所得反应混合物至轻微回流(约  $90^\circ\text{C}$ ) 持续 1-4 小时。当通过 HPLC 所测定确定反应完成时,将反应混合物逐渐冷却至室温,随后通过硅藻土床过滤。硅藻土床用乙酸乙酯 ( $2 \times 2\text{L}$ ) 洗涤,随后合并滤液和洗涤溶液。分离两个层,并且水层用乙酸乙酯 (12L) 萃取。在减压下浓缩合并的有机层以移除溶剂,并且粗 4-(1-(1-乙氧基乙基)-1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(6) 不经过进一步纯化即直接与四氢呋喃 (THF, 4.2L) 一起回装到反应器中,用于后续酸促进的脱保护反应。

[0132] 在室温下向反应器中如上所述制备的粗 4-(1-(1-乙氧基乙基)-1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(6) 在四氢呋喃 (THF, 4.2L) 中的悬浮液中装入水 ( $\text{H}_2\text{O}$ , 20.8L) 和 10% HCl 水溶液 (16.2L, 45.89mol, 3.44 当量)。在  $16-30^\circ\text{C}$  下搅拌所得反应混合物 2-5 小时。当通过 HPLC 分析确定反应完成时,反应混合物在室温下用 30% 氢氧化钠 (NaOH) 水溶液 (4L, 50.42mol, 3.78 当量) 处理。在室温下搅拌所得反应混合物 1-2 小时。固体通过过滤收集并且用水 ( $2 \times 5\text{L}$ ) 洗涤。湿滤饼与乙腈 (21.6L) 一起回装到反应器中,并且加热所得悬浮液至轻微回流持续 1-2 小时。接着在搅拌下逐渐冷却澄清溶液至室温,并且在冷却下使固体从溶液中沉淀析出。在室温下再搅拌混合物 1-2 小时。固体通过过滤收集,用乙腈 ( $2 \times 3.5\text{L}$ ) 洗涤,并且在烘箱中在  $45-55^\circ\text{C}$ 、减压下干燥至恒重,得到呈白色结晶固体状的 4-(1H-吡唑-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (5, 3281.7g, 理论值 3996.8g, 82.1% 产率) (根据 HPLC, 99.5 面积%)。对于  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400MHz)  $\delta$  13.41 (br. s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.67 (br. s, 1H), 8.35 (br. s, 1H), 7.72 (d, 1H,  $J=3.7\text{Hz}$ ), 7.10 (d, 1H,  $J=3.7\text{Hz}$ ), 5.61 (s, 2H), 3.51 (t, 2H,  $J=8.2\text{Hz}$ ), 0.81 (t, 2H,  $J=8.2\text{Hz}$ ), 0.13 (s, 9H) ppm;  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$  i (MW, 315.45), LCMS (EI)  $m/e$  316 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0133] 实施例 2.3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (13)

[0134]



[0135] 步骤 1. 1-二苯甲基氮杂环丁烷-3-醇盐酸盐 (9)

[0136] 二苯基甲胺 (7, 2737g, 15.0mol, 1.04 当量) 在甲醇 (MeOH, 6L) 中的溶液在室温下用来自加料漏斗的 2-(氯甲基)环氧乙烷 (8, 1330g, 14.5mol) 处理。在最初加料期间, 注意到轻微吸热。所得反应混合物在室温下搅拌 3 天, 随后升温至回流再持续 3 天。当 TLC 显示确定反应完成时, 首先将反应混合物冷却至室温并且接着在冰浴中冷却至 0-5°C。固体通过过滤收集并且用丙酮 (4L) 洗涤, 得到第一批粗制所要产物 (9, 1516g)。在减压下浓缩滤液并且所得半固体用丙酮 (1L) 稀释。此固体接着通过过滤收集得到第二批粗制所要产物 (9, 221g)。发现粗产物 1-二苯甲基氮杂环丁烷-3-醇盐酸盐 (9, 1737g, 理论值 3998.7g, 43.4% 产率) 足够纯净以致不经过进一步纯化即可用于后续反应中。对于 9:  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 300MHz),  $\delta$  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;  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClNO}$  (9 的游离碱,  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}$  MW, 239.31), LCMS (EI) m/e 240 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0137] 步骤 2. 3-羟基氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (10)

[0138] 在室温下搅拌 1-二苯甲基氮杂环丁烷-3-醇盐酸盐 (9, 625g, 2.27mol) 在 10% 碳酸钠水溶液 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 5L) 和二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5L) 中的悬浮液直到所有固体溶解。分离两个层, 并且水层用二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2L) 萃取。合并的有机物萃取物用硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 干燥并且在减压下浓缩。接着将 9 的此所得粗游离碱溶解于 THF (6L) 中并且将溶液放置到大帕尔高压罐 (Parr bomb) 中。向帕尔高压罐中添加二碳酸二-叔丁酯 ( $\text{BOC}_2\text{O}$ , 545g, 2.5mol, 1.1 当量) 和 20% 钯 (Pd)/碳 (125g, 50% 潮湿)。容器用氢气 ( $\text{H}_2$ ) 装填至 30psi 并且在室温下在稳定氢气氛围下 (容器再装填 3 次以维持压力在 30psi 下) 搅拌 18 小时。当 HPLC 显示反应完成时 (当不吸收更多氢气时), 反应混合物通过硅藻土垫过滤并且硅藻土垫用 THF (4L) 洗涤。滤液在减压下浓缩以移除溶剂并且残余物与最小量的二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 一起装载到 Biotage 150 柱上。柱用含 20-50% 乙酸乙酯的庚烷洗脱并且收集含有所要纯产物 (10) 的馏分并合并。在减压下移除溶剂, 得到呈无色油状的 3-羟基氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (10, 357g, 理论值 393.2g, 90.8% 产率), 其在室温下在真空中静置时固化。对于 10:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz),  $\delta$  4.56 (m, 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ppm。

[0139] 步骤 3. 3-氧代氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (11)

[0140] 将 3-羟基氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (10, 50g, 289mmol) 在乙酸乙酯 (400mL) 中的溶液冷却至 0°C。所得溶液接着在 0-5°C 下用固体 TEMPO (0.5g, 3.2mmol, 0.011 当量) 和溴化钾 (KBr, 3.9g, 33.2mmol, 0.115 当量) 在水 (60mL) 中的溶液处理。在保持反应温度在 0-5°C 之间下, 添加碳酸氢钠饱和水溶液 ( $\text{NaHCO}_3$ , 450mL) 和次氯酸钠水溶液 ( $\text{NaClO}$ , 10-13% 可用氯, 450mL)。添加次氯酸钠的溶液后, 反应混合物的颜色即刻改变。当添加额外量的次氯酸钠溶液时, 反应混合物的颜色逐渐消退。当 TLC 显示所有起始物质消耗时, 反应混合物的颜色不再改变。反应混合物接着用乙酸乙酯 ( $\text{EtOAc}$ , 500mL) 稀释并且分离两个层。有机层用水 (500mL) 和氯化钠饱和水溶液 (500mL) 洗涤并且用硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 干燥。接着在减压下移除溶剂得到粗产物 3-氧代氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (11, 48g, 理论值 49.47g, 97% 产率), 发现其足够纯净并且不经过进一步纯化即直接用于后续反应中。对于粗 11:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz),  $\delta$  4.65 (s, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm。

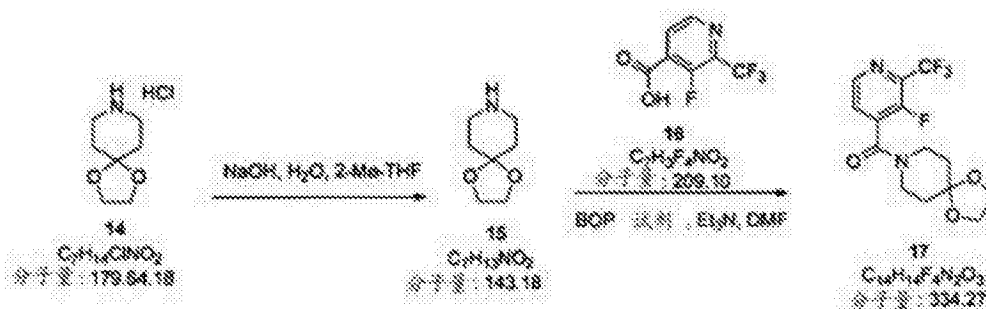
[0141] 步骤 4. 3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (13)



[0142] 在室温下向配备有热电偶套管、加料漏斗和氮气保护管的四颈烧瓶中添加氰甲基磷酸二乙酯 (12,745g, 4.20mol, 1.20 当量) 和无水四氢呋喃 (THF, 9L)。溶液用冰-甲醇浴冷却至  $-14^{\circ}\text{C}$  并且在保持反应温度低于  $-5^{\circ}\text{C}$  下经过 20 分钟添加 1.0M 叔丁醇钾 (t-BuOK) 在无四氢呋喃 (THF, 3.85L, 3.85mol, 1.1 当量) 中的溶液。所得反应混合物在  $-10^{\circ}\text{C}$  下搅拌 3 小时并且在保持内部温度低于  $-5^{\circ}\text{C}$  下经过 2 小时添加 1-叔丁氧羰基-3-氮杂环丁酮 (11,600g, 3.50mol) 在无四氢呋喃 (THF, 2L) 中的溶液。反应混合物经过 1 小时在  $-5^{\circ}\text{C}$  至  $-10^{\circ}\text{C}$  下搅拌并且接着缓慢升温至室温并在室温下搅拌过夜。反应混合物接着用水 (4.5L) 和氯化钠饱和水溶液 (NaCl, 4.5L) 稀释并且用乙酸乙酯 (EtOAc,  $2 \times 9\text{L}$ ) 萃取。合并的有机层用盐水 (6L) 洗涤并且用无水硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 干燥。在减压下移除有机溶剂并且残余物用二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4L) 稀释, 随后吸附到硅胶 ( $\text{SiO}_2$ , 1.5Kg) 上。吸附在硅胶上的粗产物通过快速柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 3.5Kg, 0-25%EtOAc/己烷梯度洗脱) 纯化, 得到呈白色固体状的 3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (13, 414.7g, 理论值 679.8g, 61% 产率)。对于  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz),  $\delta$  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 ( $\text{M}^+ + \text{Na}$ )。

[0143] 实施例 3. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (17)

[0144]



[0145] 步骤 1. 1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸烷 (15)

[0146] 向配备有机械搅拌器、加料漏斗和隔板的 30L 反应器中装入氢氧化钠 (NaOH, 1.4kg, 35mol) 和水 (7L, 3.13kg, 17.43mol)。向如此获得的溶液中添加 1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸烷盐酸 (14, 3.13kg, 17.43mol)。在  $25^{\circ}\text{C}$  下搅拌混合物 30 分钟。溶液接着用氯化钠 (1.3kg) 饱和并且用 2-甲基-四氢呋喃 ( $3 \times 7\text{L}$ ) 萃取。合并的有机层用无水硫酸钠 (1.3kg) 干燥, 过滤并且在  $50^{\circ}\text{C}$ 、减压 (70mmHg) 下浓缩。在减压 (80mmHg, bp:  $115^{\circ}\text{C}$  至  $120^{\circ}\text{C}$ ) 下蒸馏如此获得的黄色油状物得到呈澄清油状的化合物 15 (2.34kg, 16.36mol, 93.8%), 其直接用于后续偶联反应中。

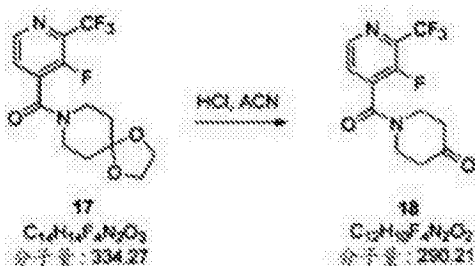
[0147] 步骤 2. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (17)

[0148] 向配备有机械搅拌器、加料漏斗、温度计和真空出口的干燥 100L 反应器中放置 3-氟-2-(三氟甲基)异烟酸 (16, 3.0kg, 14.35mol)、含六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三(二甲氨基)磷 (BOP 试剂, 7.6kg, 17.2mol, 1.20 当量) 的二甲基甲酰胺 (DMF, 18L)。在搅拌下经过 20 分钟向所得溶液中添加 1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸烷 (15, 2.34kg, 16.36mol, 1.14 当量)。接着经过 1 小时添加三乙胺 ( $\text{Et}_3\text{N}$ , 4L, 28.67mol, 2.00 当量)。在加

料期间,温度保持在 5℃与 10℃之间。在 20℃下搅拌如此获得的深棕色溶液 12 小时并且接着冷却至 10℃。在剧烈搅拌下,依序添加 18L 饱和碳酸氢钠溶液和 36L 水并且温度保持在 15℃以下。通过过滤收集如此获得的沉淀(滤饼)。水相接着用 12kg 固体氯化钠饱和并且用 EtOAc (2×18L) 萃取。合并的有机层依序用饱和碳酸氢钠溶液 (18L) 和水 (2×18L) 洗涤。将来自先前过滤的滤饼再溶解于有机相中。如此获得的深棕色溶液每次用 18L 水洗涤两次并且接着在减压 (40-50℃, 30mm Hg) 下浓缩,得到 5.0kg 呈粘稠棕色油状的粗产物。在 50℃下将以上获得的粗产物 17 溶解于 EtOH (8.15L) 中。经过 30 分钟添加水 (16.3L)。向棕色溶液中加入晶种,在搅拌下经过 3 小时冷却至 20℃并且在 20℃下搅拌 12 小时。过滤形成的沉淀物,用 EtOH 与水的混合物 (EtOH:H<sub>2</sub>O=1:20, 2L) 洗涤并且在 60℃、减压 (50mmHg) 下干燥 24 小时,得到呈白色粉末状的 (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (17, 3.98kg, 11.92mol, 83.1%)。对于 17: <sup>1</sup>H NMR (300MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 8.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=4.68Hz, 1H, NCH 在吡啶中), 7.92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=4.68Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub>=4.68Hz, 1H, NCCH 在吡啶中), 3.87-3.91 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.70 (br s, 2H, 一个 NCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 另一个 NCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 两者均处于直立位置), 3.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=5.86Hz, 2H, 一个 NCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 另一个 NCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 两者均处于平伏位置), 1.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>=5.86Hz, 2H, 一个 NCCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 另一个 NCCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 两者均处于平伏位置), 1.58 (br s, 2H, 一个 NCCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 另一个 NCCH<sub>2</sub>在哌啶环中, 两者均处于直立位置) ppm; <sup>13</sup>C NMR (75MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 161.03 (N-C=O), 151.16 (d, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=266.03Hz, C-F), 146.85 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub>=4.32Hz, NCH 在吡啶中), 135.24 (d, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=11.51Hz, C-C=O), 135.02 (四重峰, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub>=34.57Hz, NCCF<sub>3</sub>), 128.24 (d, <sup>4</sup>J<sub>CF</sub>=7.48Hz, NCCH 在吡啶中), 119.43 (d×四重峰, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub>=274.38Hz, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub>=4.89Hz, CF<sub>3</sub>), 106.74 (OCO), 64.60 (OCCO), 45.34 (NC 在哌啶环中), 39.62 (NC 在哌啶环中), 34.79 (NCC 在哌啶环中), 34.10 (NC 在哌啶环中) ppm; <sup>19</sup>F NMR (282MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ -64.69 (d, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub>=15.85Hz, F<sub>3</sub>C), -129.26 (d×四重峰, <sup>4</sup>J<sub>FF</sub>=15.85Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub>=3.96Hz, 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)。

[0149] 实施例 4. (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (18)

[0150]

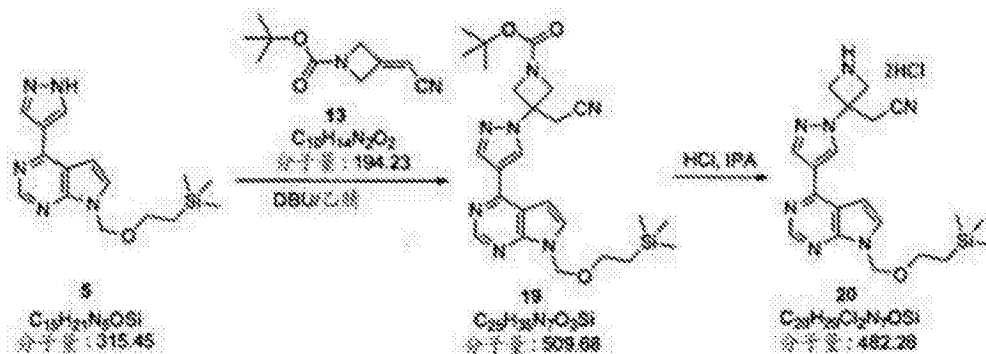


[0151] 在室温下在配有机械搅拌器、热电偶、加料漏斗和氮气进口的 5L 颈圆底烧瓶中放置含 (3-氟-2-(三氟甲基)吡啶-4-基)(1,4-二氧杂-8-氮杂螺[4,5]癸-8-基)甲酮 (17, 100g, 0.299mol) 的乙腈 (ACN, 400mL)。将所得溶液冷却至 10℃以下。在使内部温度保持低于 10℃下向反应混合物中添加 6.0N 盐酸水溶液 (HCl, 450mL, 2.70mol, 9.0 当量)。所得反应混合物接着升温至室温并且在室温下在 8 小时内经由加料漏斗将额外量的 6.0N 盐酸水溶液 (HCl, 1050mL, 6.30mol, 21.0 当量) 缓慢引入反应混合物中。接着将反应混合物冷却至 0℃, 随后在使内部温度保持低于 10℃下用 30% 氢氧化钠水溶液 (NaOH, 860mL,

8.57mmol, 28.6 当量) 处理。所得反应混合物接着升温至室温, 随后在 1 小时内添加固体碳酸氢钠 ( $\text{NaHCO}_3$ , 85.0g, 1.01mol, 3.37 当量)。混合物接着用 EtOAc ( $2 \times 1.2\text{L}$ ) 萃取, 并且合并的有机相用 16% 氯化钠水溶液 ( $2 \times 800\text{mL}$ ) 洗涤并通过真空蒸馏浓缩至约 1.0L。向残余物中添加庚烷 (2.1L), 并且通过真空蒸馏浓缩所得混合物至 1.0L。向浓缩混合物中添加庚烷 (2.1L)。所得白色浆料接着通过真空蒸馏浓缩至 1.0L。接着向白色浆料中添加甲基叔丁基醚 (MTBE, 1.94L)。将白色混浊物加热至  $40^\circ\text{C}$  获得澄清溶液。所得溶液通过真空蒸馏浓缩至约 1.0L。在室温下搅拌混合物 1 小时。在抽真空下通过过滤收集白色沉淀物。滤饼用庚烷 (400mL) 洗涤并且在抽真空下在氮气下在过滤器上干燥, 得到呈灰白色固体状的化合物 18 (78.3g, 90.1%)。对于 18:  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8.68 (d,  $^3J_{\text{HH}}=4.69\text{Hz}$ , 1H, NCH 在吡啶中), 7.97 (dd,  $^3J_{\text{HH}}=4.69\text{Hz}$ ,  $^4J_{\text{HF}}=4.69\text{Hz}$ , 1H, NCCH 在吡啶中), 3.92 (br s, 2H, 一个  $\text{NCH}_2$  在哌啶环中, 另一个  $\text{NCH}_2$  在哌啶环中, 两者均处于直立位置), 3.54 (t,  $^3J_{\text{HH}}=6.15\text{Hz}$ , 2H, 一个  $\text{NCH}_2$  在哌啶环中, 另一个  $\text{NCH}_2$  在哌啶环中, 两者均处于平伏位置), 2.48 (t,  $^3J_{\text{HH}}=6.44\text{Hz}$ , 2H,  $\text{NCCH}_2$ ), 2.34 (t,  $^3J_{\text{HH}}=6.15\text{Hz}$ , 2H,  $\text{NCCH}_2$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  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 (C-C=O), 134.78-135.56 (m,  $\text{NCCF}_3$ ), 128.27 (d,  $^3J_{\text{CF}}=7.19\text{Hz}$ , NCCH 在吡啶中), 119.52 (d  $\times$  四重峰,  $^1J_{\text{CF}}=274.38\text{Hz}$ ,  $^3J_{\text{CF}}=4.89\text{Hz}$ ,  $\text{CF}_3$ ), 45.10 (NC 在哌啶环中) ppm, 一个碳 (NCC 在哌啶环中) 由于与  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  重叠而缺失;  $^{19}\text{F}$  NMR (282MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  -64.58 (d,  $^4J_{\text{FF}}=15.85\text{Hz}$ ,  $\text{F}_3\text{C}$ ), -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 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0152] 实施例 5.3-[4-(7-{2-(三甲基硅烷基)乙氧基}甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐 (20)

[0153]



[0154] 步骤 1.3-(氰基甲基)-3-(4-(7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡啶-1-基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (19)

[0155] 在  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  下在配备有机械搅拌器、温度计、加料漏斗和真空出口的干燥 30L 反应器中放置 4-(1H-吡啶-4-基)-7-((2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶 (5, 4.50kg, 14.28mol)、含 3-(氰基亚甲基)氮杂环丁烷-1-甲酸叔丁酯 (13, 3.12kg, 16.08mol, 1.126 当量) 的乙腈 (9L)。经过 40 分钟向所得粉红色悬浮液中添加 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯 (DBU, 225mL, 1.48mol, 0.10 当量)。在加料期间保持批料温度在  $10^\circ\text{C}$  与  $20^\circ\text{C}$  之间。在  $20^\circ\text{C}$  下搅拌所得棕色溶液 3 小时。在反应完成之后, 在  $20^\circ\text{C}$  下在搅拌下经过 80 分钟添加水 (18L)。向混合物中加晶种并且在室温下搅拌

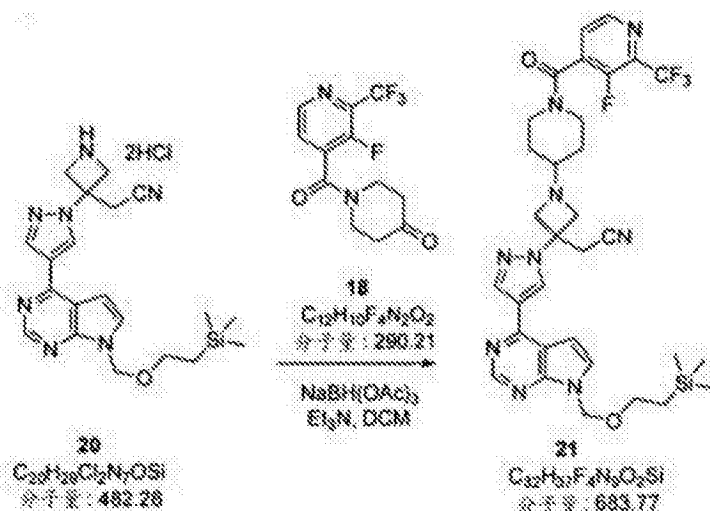
加有晶种的混合物 12 小时。通过过滤收集固体并且滤饼用乙腈与水的混合物 (1:2, 9L) 洗涤并在真空烘箱中在 60℃ 下在氮气净化下干燥 12 小时, 得到呈淡黄色粉末状的粗产物 (19, 7.34kg)。在 60℃ 下在配备有机械搅拌器、温度计、加料漏斗和隔板的 50L 反应器中将以上获得的粗产物溶解于甲基叔丁基醚 (MTBE, 22L) 中。在 60℃ 下经过 1 小时添加己烷 (22L)。接着向溶液中加入晶种, 经过 3 小时冷却至 20℃ 并且在 20℃ 下搅拌 12 小时。通过过滤收集沉淀。所得滤饼用 MTBE 与己烷的混合物 (1:15, 3L) 洗涤并且在真空烘箱中在 50℃ 下干燥 10 小时, 得到呈白色粉末状的化合物 19 (6.83kg, 13.42mol, 94.0%)。对于 19:  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.87 (s, 1H), 8.46 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.36 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 7.44 (d,  $J=3.7\text{Hz}$ , 1H), 6.82 (d,  $J=3.7\text{Hz}$ , 1H), 5.69 (s, 2H), 4.57 (d,  $J=9.6\text{Hz}$ , 2H), 4.32 (d,  $J=9.5\text{Hz}$ , 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;  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0156] 步骤 2. 3-[4-(7-{[2-(三甲基硅烷基)乙氧基]甲基}-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基}乙腈二盐酸盐 (20)

[0157] 在  $20\pm 5^\circ\text{C}$  下在配备有机械搅拌器、热电偶、加料漏斗和氮气进口的 2L4 颈圆底烧瓶中添加化合物 19 (55.0g, 0.108mol) 和甲醇 (MeOH, 440mL)。在室温下搅拌所得白色混浊物 20 分钟得到淡黄色溶液。接着经由加料漏斗在 5 分钟内将盐酸 (HCl) 在异丙醇中的溶液 (5.25M, 165mL, 0.866mol, 8.02 当量) 添加至反应混合物中。接着通过加热罩将所得反应混合物加热至 40℃。在 40℃ 下 2 小时之后, 在 40℃ 下经由加料漏斗向反应混合物中添加水 (165mL, 9.17mol, 84.8 当量) 得到淡绿色溶液。在 40℃ 下经由加料漏斗将甲基叔丁基醚 (MTBE, 440mL) 添加至所得混合物中。将所得混合物缓慢冷却至 10℃。固体通过过滤收集并且用 MTBE ( $2\times 220\text{mL}$ ) 洗涤。在抽真空下在氮气下在过滤器中干燥白色固体 18 小时得到化合物 20 (52.2g, KF 水含量 5.42%, 产率 94.9%)。对于 20:  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  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,  $J=3.8\text{Hz}$ , 1H), 7.72-7.66 (d,  $J=3.8\text{Hz}$ , 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;  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  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;  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}$  Si (20 的游离碱,  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{OSi}$ , MW 409.56), LCMS (EI)  $m/e$  410.2 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0158] 实施例 6. 2-(1-(1-(3-氟-2-(三氟甲基)异烟酰基)哌啶-4-基)-3-(4-(7-(2-(三甲基硅烷基)乙氧基)甲基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)-1H-吡唑-1-基)氮杂环丁烷-3-基)乙腈 (21)

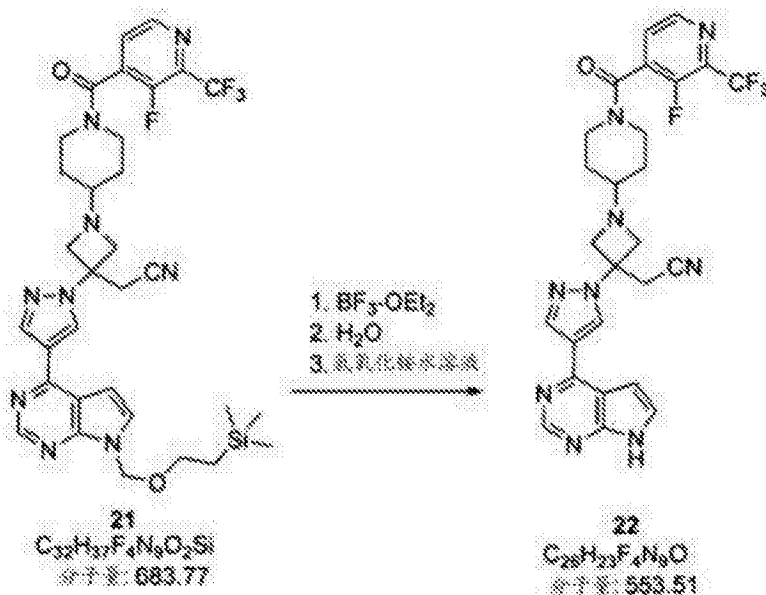
[0159]



[0160] 在  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  下在配备有机械搅拌器、热电偶、冷凝器和氮气进口的 100L 干燥反应器中添加 (20, 3.24kg, 6.715mol) 和二氯甲烷 (32L)。在室温下搅拌混合物 10 分钟, 随后用三乙胺 (TEA, 1.36kg, 13.44mol, 2.00 当量) 在保持内部温度在  $15\text{--}30^\circ\text{C}$  下的加料速率下处理。接着在室温下将化合物 18 (2.01kg, 6.926mol, 1.03 当量) 添加至反应器中。在 10 分钟之后, 在使内部温度保持在  $15\text{--}30^\circ\text{C}$  下在 1 小时内将三乙酰氧基硼氢化钠 ( $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , 2.28kg, 10.75mol, 1.60 当量) 逐份添加至反应器中。在  $15\text{--}30^\circ\text{C}$  下再搅拌所得反应混合物 1 小时。一旦确定还原性胺化反应完成, 就用 4% 碳酸氢钠水溶液 ( $\text{NaHCO}_3$ , 32L) 处理反应混合物以将 pH 值调整至 7-8。在室温下搅拌 30 分钟之后, 分离两个相。水相用二氯甲烷 (29L) 萃取。合并的有机相依序用 0.1N 盐酸水溶液 (16L)、4% 碳酸氢钠水溶液 (16L)、8% 氯化钠水溶液 ( $2 \times 16\text{L}$ ) 洗涤。部分浓缩所得有机相并且过滤。通过在真空下逐渐添加乙腈 (65L) 来对滤液进行溶剂交换。白色固体通过过滤收集, 用乙腈 (10L) 洗涤并且在真空烘箱中在  $40\text{--}50^\circ\text{C}$  下在氮气净化下干燥, 得到化合物 21 (4.26kg, 6.23mol, 92.9%)。对于 21:  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8.84 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.66 (d,  $J=4.7\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (s, 1H), 7.90 (t,  $J=4.7\text{Hz}$ , 1H), 7.78 (d,  $J=3.7\text{Hz}$ , 1H), 7.17 (d,  $J=3.7\text{Hz}$ , 1H), 5.63 (s, 2H), 4.07 (dt,  $J=11.1, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.75 (d,  $J=7.8\text{Hz}$ , 2H), 3.57 (dd,  $J=10.2, 7.8\text{Hz}$ , 2H), 3.55 (s, 2H), 3.52 (dd,  $J=8.5, 7.4\text{Hz}$ , 2H), 3.41 (dq,  $J=13.3, 4.3\text{Hz}$ , 1H), 3.26 (t,  $J=10.0\text{Hz}$ , 1H), 3.07 (ddd,  $J=13.1, 9.4, 3.2\text{Hz}$ , 1H), 2.56 (dt,  $J=8.5, 4.7\text{Hz}$ , 1H), 1.81-1.73 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.21 (m, 1H), 0.82 (dd,  $J=8.5, 7.4\text{Hz}$ , 2H), -0.12 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  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;  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_2\text{Si}$  (MW, 683.77), LCMS (EI) m/e 684.2 ( $\text{M}^+\text{H}$ )。

[0161] 实施例 7.2-(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) 异烟酰基) 哌啶-4-基) 氮杂环丁烷-3-基) 乙腈 (22)

[0162]

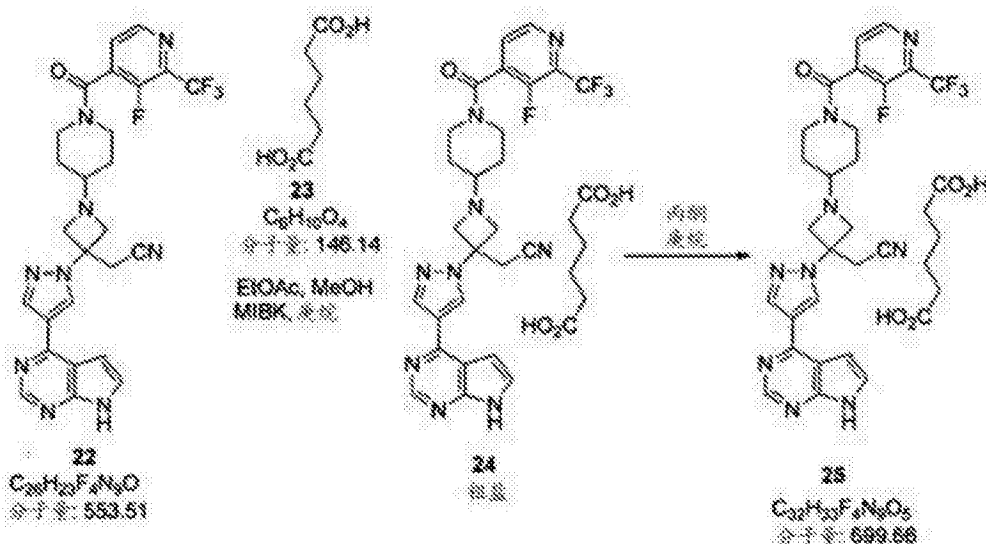


[0163] 在  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  下向配备有机械搅拌器、热电偶、加料漏斗和氮气进口的 250mL 4 颈圆底烧瓶中添加化合物 21 (9.25g, 13.52mmol, KF 水含量 3.50%) 和乙腈 (74mL)。将所得白色浆料冷却至  $5^\circ\text{C}$  以下。接着以同时使内部温度保持低于  $5.0^\circ\text{C}$  的速率添加三氟化硼二乙醚合物 ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , 6.46mL, 51.37mmol, 3.80 当量)。反应混合物接着升温至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 。在  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  下搅拌 18 小时之后, 将反应混合物冷却至  $0-5^\circ\text{C}$  并且在低于  $5.0^\circ\text{C}$  下将额外量的  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (0.34mL, 2.70mmol, 0.2 当量) 引入反应混合物中。所得反应混合物升温至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ , 并且在室温下再保持搅拌 5 小时。接着将反应混合物冷却至  $0-5^\circ\text{C}$ , 随后添加水 (12.17mL, 0.676mol, 50 当量)。在添加水期间保持内部温度低于  $5.0^\circ\text{C}$ 。所得混合物升温至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  并且在室温下保持搅拌 2 小时。接着将反应混合物冷却至  $0-5^\circ\text{C}$  并且添加氢氧化铵水溶液 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 5N, 121.7mmol, 9.0 当量)。在添加氢氧化铵水溶液期间, 内部温度保持低于  $5.0^\circ\text{C}$ 。所得反应混合物升温至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  并且在室温下搅拌 20 小时。一旦确定 SEM 脱保护完成, 即过滤反应混合物, 并且用 EtOAc (9.25mL) 洗涤固体。合并滤液并且用 EtOAc (74mL) 稀释。稀释的有机溶液用 13% 氯化钠水溶液 (46.2mL) 洗涤。有机相接着用 EtOAc (55.5mL) 稀释, 随后在减压下浓缩至最小体积。将 EtOAc (120mL) 添加至残余物中, 在  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  下搅拌所得溶液 30 分钟。溶液接着用 7% 碳酸氢钠水溶液 ( $2 \times 46\text{mL}$ ) 和 13% 碳酸氢钠水溶液 (46mL) 洗涤。所得有机相用 EtOAc (46mL) 稀释并且在  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  下用水 (64mL) 处理 30 分钟。将混合物冷却至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  并且分离两个相。有机相在  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  下第二次用水 (64mL) 处理 30 分钟。将混合物冷却至  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  并且分离两个相。浓缩所得有机相得到粗化合物 22 (游离碱), 其通过柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 330g, 用含 0-10% MeOH 的 EtOAc 梯度洗脱) 进一步纯化得到呈灰白色固体状的分析纯游离碱 (22, 7.00g, 93.5%)。对于 22:  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  12.17 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (s, 1H), 8.70 (m, 2H), 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), 4.10 (m, 1H), 3.78 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 2H), 3.61 (t,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 3.58 (s, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.28 (t,  $J=10.5\text{Hz}$ , 1H), 3.09 (ddd,  $J=13.2, 9.5, 3.1\text{Hz}$ , 1H), 2.58 (m, 1H), 1.83-1.75 (m, 1H), 1.70-1.63 (m, 1H), 1.35-1.21 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (101MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  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, 27.19ppm;  $C_{26}H_{23}F_4N_9O$  (MW, 553.51), LCMS(EI)m/e554.1 ( $M^+H$ )。

[0164] 实施例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)异烟酰基)哌啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基)乙腈己二酸盐(25)

[0165]



[0166] 步骤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)异烟酰基)哌啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基)乙腈己二酸盐粗盐(24)

[0167] 遵循实施例7中制备化合物22的方法,例外之处为最终有机相通过真空蒸馏浓缩至最小体积以得到粗化合物22,其不经过分离而直接用于后续己二酸盐形成方法中。在室温下向含有粗化合物22的浓缩残余物中添加甲醇(200mL)。混合物通过真空蒸馏浓缩至最小体积。接着向残余物中添加甲醇(75mL)并且加热所得溶液至回流持续2小时。向溶液中添加甲基异丁基酮(MIBK,75mL)并且所得混合物在使内部温度保持在40-50℃下在真空下蒸馏至约30mL。添加甲醇(75mL)并且加热所得混合物至回流持续2小时。向溶液中添加MIBK(75mL)。在使内部温度保持在40-50℃下在真空下再次蒸馏混合物至约30mL。向溶液中添加己二酸(23,2.15g,14.77mmol)在甲醇(75mL)中的溶液。接着加热所得溶液至回流持续2小时。添加MIBK(75mL)。在使内部温度保持在40-50℃下在真空下蒸馏混合物至约60mL。停止加热并且经过1-2小时添加庚烷(52.5mL)。在20±5℃下搅拌所得混合物3-4小时。白色沉淀物通过过滤收集,并且用庚烷(2×15mL)洗涤滤饼。在20±5℃下在抽真空下在氮气下在过滤器上干燥固体12小时,得到化合物24(粗己二酸盐,8.98g,12.84mmol,95.0%)。对于24:<sup>1</sup>H NMR(400MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ 12.16(s,1H),12.05(brs,2H),8.85(s,1H),8.72(s,1H),8.69(d,J=4.7Hz,1H),8.45(s,1H),7.93(t,J=4.7Hz,1H),7.63(dd,J=3.6,2.3Hz,1H),7.09(dd,J=3.6,1.7Hz,1H),δ 4.11(dt,J=11.0,4.4Hz,1H),3.77(d,J=7.8Hz,2H),3.60(t,J=7.8Hz,2H),3.58(s,2H),3.44(dt,J=14.4,4.6Hz,1H),3.28(t,J=10.4Hz,1H),3.09(ddd,J=13.2,9.6,3.2Hz,1H),2.58(tt,J=8.6,3.5Hz,1H),2.28-2.17(m,4H),1.83-1.74(m,1H),1.67(d,J=11.0Hz,1H),1.59-1.46(m,4H),1.37-1.21(m,2H)ppm;<sup>13</sup>C NMR(101MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>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;  $C_{32}H_{33}F_4N_9O_5$  (分子量: 699.66; 24:  $C_{26}H_{23}F_4N_9O$ , MW553.51), LCMS(EI) m/e554.0 ( $M^+H$ )。

[0168] 步骤 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)异烟酰基)哌啶-4-基)氮杂环丁烷-3-基)乙腈己二酸盐 (25)

[0169] 在配备有机械搅拌器、热电偶、加料漏斗和氮气进口的 100L 干燥反应器中添加化合物 24 (3.40kg, 4.86mol) 和丙酮 (23.8L)。将所得白色混浊物加热至 55-60°C 得到澄清溶液。所得溶液通过在线过滤器过滤到另一个 100L 反应器中。庚烷 (23.8L) 通过在线过滤器过滤到单独 50L 反应器中。接着在 100L 反应器中将经过过滤的庚烷以使内部温度保持在 55-60°C 下的速率装到丙酮溶液中。接着将 100L 反应器中的反应混合物冷却至 20±5°C 并且在 20±5°C 下搅拌 16 小时。白色沉淀物通过过滤收集并且滤饼用庚烷 (2×5.1L) 洗涤并且在抽真空下在氮气下在过滤器上干燥。固体进一步在真空烘箱中在 55-65°C 下在氮气净化下干燥, 得到呈白色至灰白色粉末状的化合物 25 (3.11kg, 92.2%)。对于 25:  $^1H$  NMR (400MHz,  $(CD_3)_2SO$ )  $\delta$  12.16 (s, 1H), 12.05 (brs, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.69 (d, J=4.7Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.93 (t, J=4.7Hz, 1H), 7.63 (dd, J=3.6, 2.3Hz, 1H), 7.09 (dd, J=3.6, 1.7Hz, 1H),  $\delta$  4.11 (dt, J=11.0, 4.4Hz, 1H), 3.77 (d, J=7.8Hz, 2H), 3.60 (t, J=7.8Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.44 (dt, J=14.4, 4.6Hz, 1H), 3.28 (t, J=10.4Hz, 1H), 3.09 (ddd, J=13.2, 9.6, 3.2Hz, 1H), 2.58 (tt, J=8.6, 3.5Hz, 1H), 2.28-2.17 (m, 4H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.67 (d, J=11.0Hz, 1H), 1.59-1.46 (m, 4H), 1.37-1.21 (m, 2H) ppm;  $^{13}C$  NMR (101MHz,  $(CD_3)_2SO$ )  $\delta$  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;  $C_{32}H_{33}F_4N_9O_5$  (分子量: 699.66; 游离碱:  $C_{26}H_{23}F_4N_9O$  (MW, 553.51), LCMS(EI) m/e554.0 ( $M^+H$ )。

[0170] 实施例 A: 体外 JAK 激酶测定

[0171] 根据 Park 等, Analytical Biochemistry 1999, 269, 94-104 中所述的以下体外测定测试本文式 I 化合物对 JAK 靶标的抑制活性。使用杆状病毒在昆虫细胞中表达具有 N 端 His 标签的人 JAK1 (a. a. 837-1142) 和 JAK2 (a. a. 828-1132) 的催化结构域并且加以纯化。通过测量生物素化肽的磷酸化来测定 JAK1 和 JAK2 的催化活性。通过均相时间分辨荧光 (homogenous time resolved fluorescence; HTRF) 检测磷酸化肽。在 40  $\mu$ L 反应中测量化合物对各激酶的  $IC_{50}$ , 所述反应在含 100mM NaCl、5mM DTT 和 0.1mg/mL (0.01%) BSA 的 50mM Tris (pH7.8) 缓冲液中含有酶、ATP 和 500nM 肽。对于 1mM  $IC_{50}$  测量, 反应中的 ATP 浓度为 1mM。在室温下进行反应 1 小时并且接着用 20  $\mu$ L 含 45mM EDTA、300nM SA-APC、6nM Eu-Py20 的测定缓冲液 (Perkin Elmer, Boston, MA) 终止。与标记抗体的结合进行 40 分钟并且在融合板读取器 (Fusion plate reader) (Perkin Elmer, Boston, MA) 上测量 HTRF 信号。实施例 1 的化合物和己二酸盐对 JAK1 的  $IC_{50} \leq 5nM$  (在 1mM ATP 下测量), 其中 JAK2/JAK1 比率 >10 (在 1mM ATP 下测量)。

[0172] 实施例 B: 细胞测定



[0173] 生长依赖于细胞因子并且因此依赖于 JAK/STAT 信号转导的癌细胞系可以在 RPMI1640、10%FBS 和 1nG/mL 适当细胞因子中以每孔 (96 孔板格式) 6000 个细胞涂铺。可以将化合物在 DMSO/ 培养基 (最终浓度 0.2%DMSO) 中添加至细胞中并且在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下培育 72 小时。使用 CellTiter-Glo 发光细胞活力测定 (Promega), 随后进行 TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA) 定量来评估化合物对细胞活力的影响。使用测定读数相同的非 JAK 驱动的细胞系并行测量化合物的潜在脱靶 (off-target) 效应。所有实验通常一式两份执行。

[0174] 以上细胞系也可以用于检查化合物对 JAK 激酶或潜在下游底物 (如 STAT 蛋白质、Akt、Shp2 或 Erk) 的磷酸化的影响。这些实验可以在细胞因子饥饿过夜, 随后与化合物一起短暂预培育 (2 小时或更少) 并且细胞因子刺激约 1 小时或更少之后执行。接着从细胞中提取蛋白质并且通过本领域技术人员熟知的技术进行分析, 所述技术包括使用可以区分磷酸化蛋白质与总蛋白质的抗体进行蛋白质印迹 (Western blotting) 或 ELISA。这些实验可以利用正常细胞或癌细胞来研究化合物对肿瘤细胞存活生物学或对炎症性疾病介质的活性。例如, 对于后者来说, 可以使用细胞因子 (如 IL-6、IL-12、IL-23 或 IFN) 来刺激 JAK 活化, 从而导致 STAT 蛋白质磷酸化并且可能导致转录概况变化 (通过阵列或 qPCR 技术评估) 或产生和 / 或分泌如 IL-17 的蛋白质。可以使用本领域技术人员常用的技术测量化合物抑制这些细胞因子介导的效应的能力。

[0175] 也可以在设计用来评价本文化合物针对突变型 JAK (例如骨髓增生性病症中所发现的 JAK2V617F 突变) 的效能和活性的细胞模型中测试本文化合物。这些实验常利用血液谱系的其中异位表达野生型或突变型 JAK 激酶的细胞因子依赖性细胞 (例如 BaF/3) (James, C. 等 Nature434:1144-1148 ;Staerk, J. 等 JBC280:41893-41899)。终点包括化合物对细胞存活、增殖以及磷酸化 JAK、STAT、Akt 或 Erk 蛋白质的影响。

[0176] 可以评价本文某些化合物抑制 T 细胞增殖的活性。这种测定可以视为第二细胞因子 (即 JAK) 驱动的增殖测定以及对免疫活化的免疫遏制或抑制的简化测定。以下为可以如何执行所述实验的简要概述。使用菲科尔希帕克 (Ficoll Hypaque) 分离方法从人全血样品制备外周血液单核细胞 (PBMC) 并且可以通过淘析从 PBMC 获得 T 细胞 (2000 部分)。新鲜分离的人 T 细胞可以在 37°C 下以密度  $2 \times 10^6$  个细胞 /ml 维持在培养基 (补充有 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI1640) 中至多 2 天。对于 IL-2 刺激的细胞增殖分析, T 细胞首先用最终浓度为 10  $\mu$ g/mL 的植物血球凝集素 (Phytohemagglutinin, PHA) 处理 72 小时。在用 PBS 洗涤一次之后, 在 96 孔板中每孔涂铺 6000 个细胞并且用在培养基中不同浓度的化合物在 100U/mL 人 IL-2 (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel) 存在下处理。各板在 37°C 下培育 72 小时并且遵循制造商建议的方案使用 CellTiter-Glo 发光试剂 (Promega; Madison, WI) 评估增殖指数。

[0177] 实施例 C: 活体内抗肿瘤功效

[0178] 可以在免疫受损小鼠中的人肿瘤异种移植模型中评价本文化合物。例如, 可以使用 INA-6 浆细胞瘤细胞系的致肿瘤变异体皮下接种 SCID 小鼠 (Burger, R. 等 Hematol J. 2:42-53, 2001)。携带肿瘤的动物可以接着随机分成药物或媒介物治疗组并且可以通过许多常用途径施用不同剂量的化合物, 包括经口、腹膜内或使用可植入泵进行连续输注施用。使用测径器追踪肿瘤随时间的生长。此外, 可以在治疗起始后的任何时间收集肿瘤样品以供如上 (实施例 B) 所述进行分析来评价化合物对 JAK 活性和下游信号传导途径的影

响。此外,可以使用由其它已知激酶(例如 Bcr-Abl)驱动的异种移植肿瘤模型(如 K562 肿瘤模型)评估化合物的选择性。

#### [0179] 实施例 D:鼠类皮肤接触迟发性超敏反应测试

[0180] 也可以测试本文化合物在 T 细胞驱动的鼠类迟发性超敏测试模型中的功效(抑制 JAK 靶标的功效)。鼠类皮肤接触迟发型超敏(DTH)反应视为临床接触性皮炎和其它 T 淋巴细胞介导的免疫皮肤病症(如牛皮癣)的有效模型(Immunol Today, 1998 年 1 月;19(1):37-44)。鼠类 DTH 与牛皮癣共有多种特征,包括免疫浸润、伴有炎症性细胞因子增加和角化细胞过度增殖。此外,在临床上有效治疗牛皮癣的许多类别的药剂也是小鼠中的 DTH 反应的有效抑制剂(Agents Actions, 1993 年 1 月;38(1-2):116-21)。

[0181] 在第 0 天和第 1 天,用抗原 2,4,二硝基-氟苯(DNFB)对 Balb/c 小鼠的剃过毛的腹部局部应用来致敏所述小鼠。在第 5 天,使用工程师用测微计测量耳的厚度。记录此测量结果并且用作基线。动物的双耳接着均通过局部应用总计 20  $\mu$ L (10  $\mu$ L 在内耳廓上并且 10  $\mu$ L 在外耳廓上)浓度为 0.2% 的 DNFB 进行激发。在激发后 24 至 72 小时,再次测量耳。在整个致敏和激发阶段期间(第 -1 天至第 7 天)或在激发阶段之前和整个激发阶段期间(通常在第 4 天下午至第 7 天)给与测试化合物治疗。全身性或局部(向耳局部应用治疗)施用测试化合物(以不同浓度)的治疗。测试化合物的功效由相较于未治疗情形的耳肿胀减轻指示。引起减轻 20% 或以上的化合物视为有效。在一些实验中,小鼠受到激发但未致敏(阴性对照)。

[0182] 测试化合物的抑制效应(抑制 JAK-STAT 途径的活化)可以通过免疫组织化学分析进行确认。JAK-STAT 途径的活化会导致功能性转录因子的形成和易位。此外,免疫细胞的流入和角化细胞的增殖增加也应提供耳中可以进行研究和定量的独特表达概况变化。使用与磷酸化 STAT3 特异性相互作用的抗体(克隆 58E12, Cell Signaling Technologies),对经过福尔马林固定并且经过石蜡包封的耳切片(在 DTH 模型中在激发阶段之后收集)进行免疫组织化学分析。小鼠耳用测试化合物、媒介物或地塞米松(dexamethasone)(用于牛皮癣的临床有效治疗)处理,或在 DTH 模型中不经过任何处理以供比较。测试化合物和地塞米松在定性上均可以产生类似转录变化,并且测试化合物与地塞米松均可以降低浸润细胞数。全身性和局部施用测试化合物均可以产生抑制效应,即降低浸润细胞数和抑制转录变化。

#### [0183] 实施例 E:体内抗炎活性

[0184] 可以在设计用来重复单一或复杂炎症反应的啮齿动物或非啮齿动物模型中评价本文化合物。例如,可以使用啮齿动物关节炎模型来评价预防性或治疗性给药的化合物的治疗潜力。这些模型包括(但不限于)小鼠或大鼠胶原诱发的关节炎、大鼠佐剂诱发的关节炎和胶原抗体诱发的关节炎。包括(但不限于)多发性硬化症、I 型糖尿病、葡萄膜视网膜炎、甲状腺炎、重症肌无力、免疫球蛋白性肾病、心肌炎、气道致敏(哮喘)、狼疮或结肠炎在内的自身免疫性疾病也可用于评价本文化合物的治疗潜力。这些模型在研究团体中充分确立并且为本领域技术人员所熟知(Current Protocols in Immunology, 第 3 卷, Coligan, J.E. 等, Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: 第 225 卷, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. 和 Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.)。

#### [0185] 实施例 F:用于干眼症、葡萄膜炎和结膜炎治疗的动物模型

[0186] 可在本领域技术人员已知的一个或多个临床前干眼症模型中评价药剂,所述模型包括(但不限于)兔伴刀豆凝集素 A(concanavalin A, ConA) 泪腺模型、莨菪碱(scopolamine) 小鼠模型(皮下或经皮)、肉毒杆菌(Botulinum) 小鼠泪腺模型,或导致眼腺功能障碍的许多自发性啮齿动物自身免疫模型(例如 NOD-SCID、MRL/lpr 或 NZB/NZW) 中的任一个(Barabino 等, *Experimental Eye Research* 2004, 79, 613-621 和 Schrader 等, *Developmental Ophthalmology*, Karger 2008, 41, 298-312, 其各自以引用的方式整体并入本文)。这些模型中的终点可包括眼腺和眼(角膜等)的组织病理学并且可能包括测量泪产生的典型斯戈默(Schirmer) 测试或其改进形式(Barabino 等)。可通过可在可测量的疾病存在之前或之后开始的经由多种施用途径(例如全身性或局部)给药来评估活性。

[0187] 可在本领域技术人员已知的一个或多个临床前葡萄膜炎模型中评价药剂。这些模型包括(但不限于)实验性自身免疫性葡萄膜炎(EAU) 和内毒素诱发的葡萄膜炎(EIU) 模型。EAU 实验可在兔、大鼠或小鼠中执行并且可涉及被动或主动免疫。例如,可使用许多视网膜抗原中的任一个使动物对相关免疫原敏感,此后可用相同抗原对动物进行经眼激发。EIU 模型更急性并且涉及以亚致死剂量局部或全身性施用脂多糖。EIU 模型和 EAU 模型的终点均可尤其包括眼底检查、组织病理学。这些模型由 Smith 等(*Immunology and Cell Biology* 1998, 76, 497-512, 其以引用的方式整体并入本文)评述。通过可在可测量的疾病存在之前或之后开始的经由多种施用途径(例如全身性或局部)给药来评估活性。以上所列的一些模型也可发展巩膜炎/上巩膜炎、脉络膜炎、睫状体炎或虹膜炎,并且因此适用于研究化合物对于治疗性治疗这些疾病的潜在活性。

[0188] 也可在本领域技术人员已知的一个或多个临床前结膜炎模型中评价药剂。这些模型包括(但不限于)利用豚鼠、大鼠或小鼠的啮齿动物模型。豚鼠模型包括利用以如卵清蛋白(ovalbumin) 或豚草(ragweed) 的抗原进行的主动或被动免疫和/或免疫激发方案的模型(在 Groneberg, D. A. 等, *Allergy* 2003, 58, 1101-1113 中评述,其以引用的方式整体并入本文)。大鼠和小鼠模型在整体设计方面类似于豚鼠中的模型(也由 Groneberg 评述)。可通过可在可测量的疾病存在之前或之后开始的经由多种施用途径(例如全身性或局部)给药来评估活性。所述研究的终点可包括(例如)对如结膜的眼组织进行的组织学、免疫学、生物化学或分子分析。

[0189] 实施例 G:骨的体内保护

[0190] 可在本领域技术人员已知的骨质减少、骨质疏松或骨再吸收的各种临床前模型中评价化合物。例如,可使用卵巢切除的啮齿动物来评价化合物影响骨重塑和/或骨密度的体征和标志的能力(W. S. S. Jee 和 W. Yao, *J Musculoskel. Nueron. Interact.*, 2001, 1(3), 193-207, 其以引用的方式整体并入本文)。或者,可在疗法(例如糖皮质激素)诱发的骨质减少模型中在对照或化合物治疗的啮齿动物中评价骨密度和构造(Yao 等 *Arthritis and Rheumatism*, 2008, 58(6), 3485-3497; 和同上 58(11), 1674-1686, 其均以引用的方式整体并入本文)。此外,可在以上(实施例 E) 论述的啮齿动物关节炎模型中评价化合物对骨再吸收和密度的影响。所有这些模型的终点均可变化,但通常包括组织学和放射学评估以及骨重塑的免疫组织学和适当生物化学标志。

[0191] 已描述本发明的许多实施方案。然而,应了解可在不脱离本发明的精神和范围的情况下做出各种修改。因此,其它实施方案在以上权利要求的范围内。