

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 355**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07F 5/04 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2014 PCT/US2014/020554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14138168**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014 E 14712913 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2964650**

54 Título: **Procesos y productos intermedios para elaborar un inhibidor de JAK**

30 Prioridad:

06.03.2013 US 201361773659 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2019

73 Titular/es:

**INCYTE HOLDINGS CORPORATION (100.0%)
Experimental Station Route 141&Henry Clay
Road Building E336/207
Wilmington, Delaware 19880, US**

72 Inventor/es:

**LIU, PINGLI;
WANG, DENGJIN;
WU, YONGZHONG;
CAO, GANFENG y
XIA, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 707 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Procesos y productos intermedios para elaborar un inhibidor de JAK

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/773.659, presentada el 6 de marzo de 2013.

CAMPO TÉCNICO

10 Esta invención se refiere a procesos y productos intermedios para elaborar {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-3-il}acetonitrilo, útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de las Janus quinasas (JAK) incluyendo trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunes, cáncer y otros enfermedades.

ANTECEDENTES

15 Las proteínas quinasas (PK) regulan diversos procesos biológicos, incluyendo el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación, la formación de órganos, la morfogénesis, la neovascularización, la reparación de tejidos, y la regeneración, entre otros. Las proteínas quinasas también desempeñan papeles especializados en una serie de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Las citoquinas, los polipéptidos de bajo peso molecular o las glicoproteínas, regulan muchas vías implicadas en la respuesta inflamatoria del huésped a la sepsis. Las citoquinas influyen en la diferenciación, la proliferación y la activación celular, y pueden modular tanto las respuestas proinflamatorias como las antiinflamatorias para permitir que el huésped reaccione adecuadamente a los patógenos. La señalización de una amplia gama de citoquinas implica a la familia de las Janus quinasas (JAK) de proteínas tirosina quinasas y transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT). Hay cuatro JAK mamíferas conocidas: JAK1 (Janus quinasa 1), JAK2, JAK3 (también conocida como Janus quinasa, leucocito; JAKL; y L-JAK), y TYK2 (proteína tirosina quinasa 2).

20 Las respuestas inmunes e inflamatorias estimuladas por citoquinas contribuyen a la patogénesis de enfermedades: patologías como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) surgen de la supresión del sistema inmunitario, mientras que una respuesta inmune/inflamatoria hiperactiva o inapropiada contribuye a la patología de las enfermedades autoinmunes (por ejemplo, asma, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, miocarditis) y enfermedades como la esclerodermia y la osteoartritis (Ortmann, R.A., T. Cheng, et al. (2000) Arthritis Res 2(1): 16-32).

25 Las deficiencias en la expresión de JAK se asocian con muchos estados de enfermedad. Por ejemplo, los ratones Jak1^{-/-} son enanos al nacer, no se alimentan y mueren perinatalmente (Rodig, S.J., M.A. Meraz, et al. (1998) Cell 93(3): 373-83). Los embriones de ratón Jak2^{-/-} son anémicos y mueren alrededor del día 12.5 postcoito debido a la ausencia de eritropoyesis definitiva.

30 Se cree que la vía JAK/STAT, y en particular las cuatro JAK, desempeñan un papel en la patogénesis de la respuesta asmática, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la bronquitis y otras enfermedades inflamatorias relacionadas del tracto respiratorio inferior. Las múltiples citoquinas que señalizan a través de JAK se han relacionado con enfermedades/afecciones inflamatorias del tracto respiratorio superior, como las que afectan a la nariz y los senos nasales (por ejemplo, rinitis y sinusitis) ya sean reacciones alérgicas clásicas o no. La vía JAK/STAT también se ha relacionado con enfermedades/afecciones inflamatorias del ojo y respuestas alérgicas crónicas.

35 La activación de JAK/STAT en los cánceres puede tener lugar por estimulación de citoquinas (por ejemplo, IL-6 o GM-CSF) o por una reducción en los supresores endógenos de la señalización de JAK como SOCS (supresor o señalización de citoquinas) o PIAS (inhibidor de proteínas de STAT activado) (Boudny, V., y Kovarik, J., Neoplasia 49:349-355, 2002). La activación de la señalización de STAT, así como otras vías descendentes de las JAK (por ejemplo, Akt), se han correlacionado con un pronóstico pobre en muchos tipos de cáncer (Bowman, T., et al. Oncogene 19:2474-2488, 2000). Los niveles elevados de citoquinas circulantes que señalizan a través de JAK/STAT desempeñan un papel causal en la caquexia y/o fatiga crónica. Como tal, la inhibición de JAK puede ser beneficiosa para los pacientes con cáncer por razones que se extienden más allá de la potencial actividad antitumoral.

40 La tirosina quinasa JAK2 puede ser beneficiosa para pacientes con trastornos mieloproliferativos, por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), metaplasia mieloide con mielofibrosis (MMM) (Levin, et al., Cancer Cell, vol. 7, 2005:387-397). La inhibición de la quinasa JAK2V617F disminuye la proliferación de células hematopoyéticas, sugiriendo que JAK2 es un objetivo potencial para la inhibición farmacológica en pacientes con PV, TE y MMM.

45 La inhibición de las JAK puede beneficiar a pacientes que padecen de trastornos inmunitarios de la piel como psoriasis, y sensibilización de la piel. Se cree que el mantenimiento de la psoriasis depende de una serie de

citoquinas inflamatorias además de varias quimiocinas y factores de crecimiento (JCI, 113:1664-1675), muchos de las cuales señalan a través de JAK (Adv Pharmacol. 2000;47:113-74).

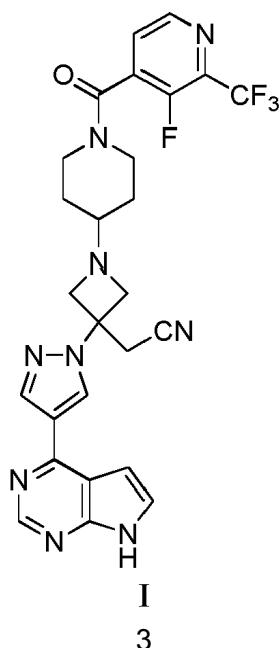
5 La JAK1 desempeña un papel central en una serie de vías de señalización de citoquinas y factores de crecimiento que, cuando se desregulan, pueden dar como resultado o contribuir a estados de enfermedad. Por ejemplo, los niveles de IL-6 están elevados en la artritis reumatoide, una enfermedad en la que se ha sugerido que tiene efectos perjudiciales (Fonesca, J.E. et al., Autoimmunity Reviews, 8:538-42, 2009). Como las señales de IL-6, al menos en parte, a través de JAK1, antagonizan con IL-6 directa o indirectamente a través de la inhibición de JAK1 se espera que proporcionen un beneficio clínico (Guschin, D., N., et al., Embo J 14:1421, 1995 ; Smolen, J.S., et al. Lancet 371:987, 2008). Además, en algunos cánceres, la JAK1 se muta dando como resultado un crecimiento y supervivencia de células tumorales no deseables constitutivos (Mullighan CG, Proc Natl Acad Sci USA. 106:9414-8, 2009; Flex E., et al. J. Exp Med. 205:751-8, 2008). En otras enfermedades autoinmunes y cánceres, los niveles sistémicos elevados de citoquinas inflamatorias que activan JAK1 también pueden contribuir a la enfermedad y/o los síntomas asociados. Por lo tanto, los pacientes con tales enfermedades pueden beneficiarse de la inhibición de JAK1. Los inhibidores selectivos de JAK1 pueden ser eficaces al mismo tiempo que evitan los efectos innecesarios y potencialmente indeseables de inhibir otras JAK quinasas.

Los inhibidores selectivos de JAK1, en relación con otras JAK quinasas, pueden tener múltiples ventajas terapéuticas sobre inhibidores menos selectivos. Con respecto a la selectividad frente a JAK2, una serie de citoquinas importantes y factores de crecimiento señalan a través de JAK2, incluyendo, por ejemplo, eritropoyetina (Epo) y trombopoyetina (Tpo) (Parganas E, et al. Cell. 93:385-95, 1998). La Epo es un factor de crecimiento clave para la producción de glóbulos rojos; por lo tanto, una escasez de señalización dependiente de Epo puede dar como resultado un número reducido de glóbulos rojos y anemia (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). La Tpo, otro ejemplo de un factor de crecimiento dependiente de JAK2, desempeña un papel central en el control de la proliferación y maduración de los megacariocitos, las células a partir de las cuales se producen las plaquetas (Kaushansky K, NEJM 354:2034-45, 2006). Como tal, la señalización reducida de Tpo disminuiría los números de megacariocitos (megacariocitopenia) y reduciría los recuentos de plaquetas circulantes (trombocitopenia). Esto puede dar como resultado un sangrado no deseado o incontrolable. La inhibición reducida de otras JAK, como JAK3 y Tyk2, también puede ser deseable, ya que se ha demostrado que los humanos que carecen de la versión funcional de estas quinasas padecen numerosas enfermedades como la inmunodeficiencia combinada grave o el síndrome de hiperinmunoglobulina E (Minegishi, Y, et al. Immunity 25:745-55, 2006 ; Macchi P, et al. Nature 377:65-8, 1995). Por lo tanto, un inhibidor de JAK1 con afinidad reducida para otras JAK tendría ventajas significativas sobre un inhibidor menos selectivo con respecto a los efectos secundarios reducidos que implican la supresión inmunitaria, la anemia y la trombocitopenia.

Debido a la utilidad de los inhibidores de JAK, hay una necesidad de desarrollar nuevos procesos para elaborar inhibidores de JAK. Esta invención está dirigida a esta necesidad y otras.

SUMARIO

Los inhibidores de JAK se describen en la US 2011/0224190 , incluyendo el {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-3-il}acetonitrilo, que se representa a continuación como Fórmula I.



La presente invención proporciona, entre otros, procesos y productos intermedios para elaborar el compuesto de Fórmula I. En particular, la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I:

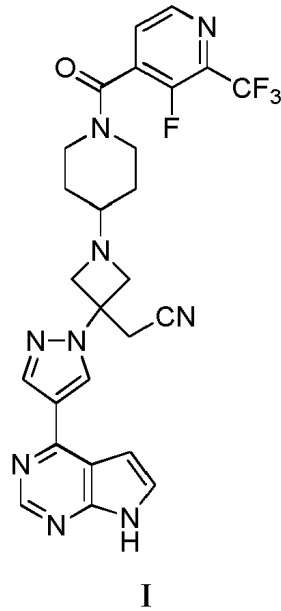
5

10

15

20

25



o una sal del mismo, que comprende:

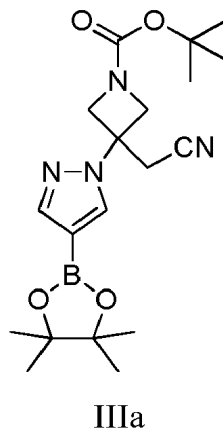
30

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IIIa:

35

40

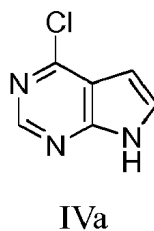
45



con un compuesto de Fórmula IVa:

50

55



60

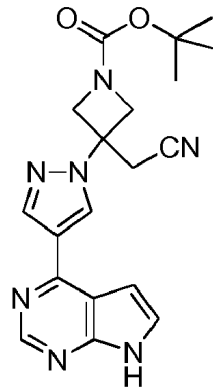
bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula IIa:

65

5

10

15

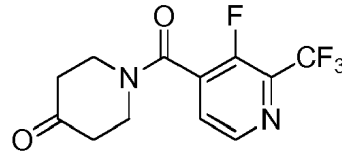


IIa;

20

desproteger el compuesto de Fórmula IIa por reacción con ácido clorhídrico para formar sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidini-yl)acetonitrilo; y hacer reaccionar la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidini-3-il)acetonitrilo con un compuesto de fórmula VI:

25



VI

30

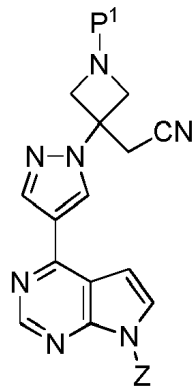
en presencia de un agente reductor para formar un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo.

También se describen en la presente procesos para elaborar un compuesto de Fórmula II:

35

40

45



II

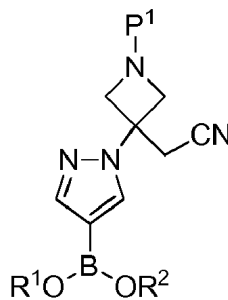
50

que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula III:

55

60

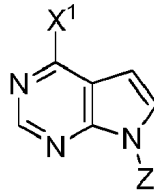
65



III

con un compuesto de Fórmula IV:

5



10

IV

bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula II, en el que:

15

Z es H o un grupo protector;

P¹ es un grupo protector;

X¹ es halo; y

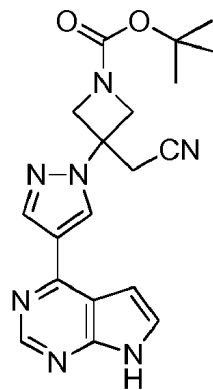
R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o

20

R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

También se describen procesos para elaborar un compuesto de Fórmula IIa:

25



30

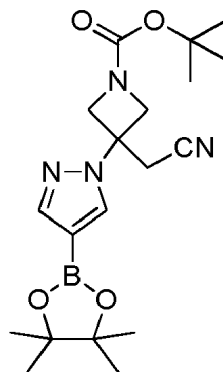
35

40

IIa

que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IIIa:

45



50

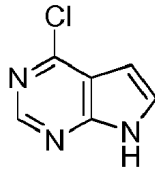
55

IIIa

60 con un compuesto de Fórmula IVa:

65

5

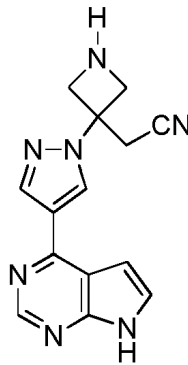


IVa

10 bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula IIa, en donde las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula IIIa, el compuesto de Fórmula IVa, [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II), fluoruro de cesio, y un componente solvente, en donde el componente solvente comprende agua y terc-butanol.

15 También se describe un proceso para desproteger un compuesto de Fórmula II o IIa para formar un compuesto de Fórmula V:

20



25

30

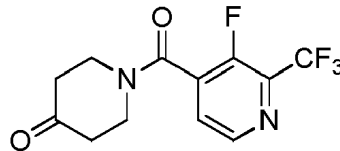
V

o sal del mismo.

35

También se describe un proceso que comprende además hacer reaccionar un compuesto de Fórmula V, o una sal del mismo, con un compuesto de Fórmula VI:

40



45

VI

en presencia de un agente reductor para formar un compuesto de Fórmula I:

50

55

60

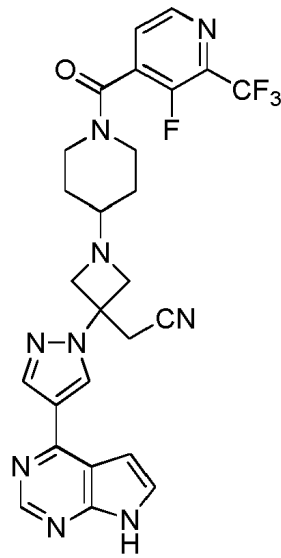
65

5

10

15

20



I

o una sal del mismo.

25

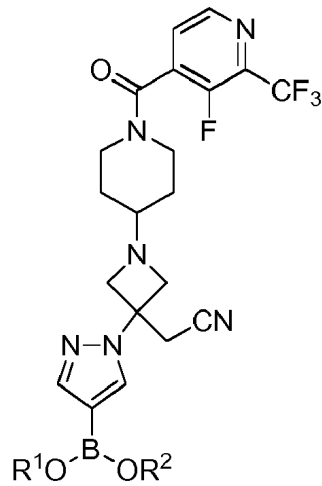
También se describen compuestos de Fórmula VII:

30

35

40

45



VII

o sales de los mismos; en los que:

50

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o
 R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

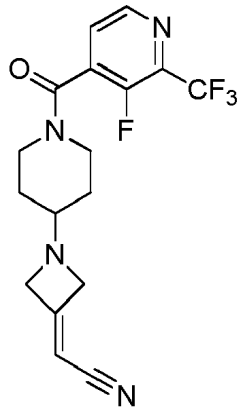
55

También se describen procesos para elaborar un compuesto de Fórmula VII, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VIII:

60

65

5



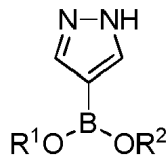
10

15

VIII

con un compuesto de fórmula IX:

20



25

IX

30

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula VII; en el que:

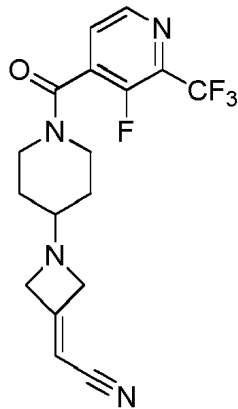
R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o

R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

35

También se describen procesos para elaborar un compuesto de Fórmula VIIa, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VIII, o una sal del mismo:

40



45

50

55

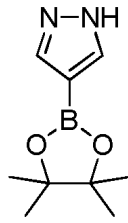
VIII

con un compuesto de Fórmula IXa:

60

65

5

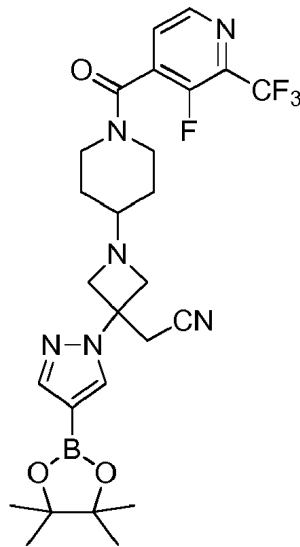


10

IXa

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula VIIa:

15



20

25

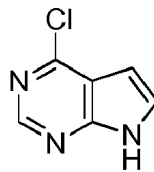
30

35

VIIa.

También se describen procesos para elaborar un compuesto de Fórmula I, que comprende hacer reaccionar el compuesto de Fórmula VII o VIIa con un compuesto de Fórmula IVa:

40



45

IVa

bajo las condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula I:

50

55

60

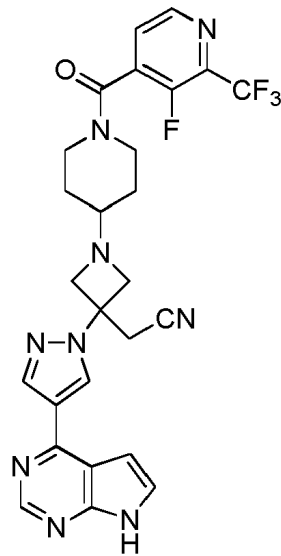
65

5

10

15

20



I

25

en donde las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula VII o VIIa, el compuesto de Fórmula IVa, un catalizador de acoplamiento de Suzuki, una base y un componente solvente.

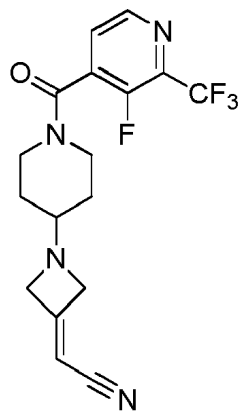
También se describe un compuesto de Fórmula VIII:

30

35

40

45



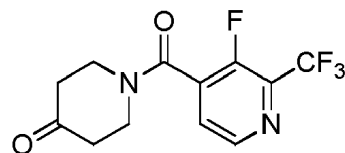
VIII

o una sal del mismo.

50

También se describen procesos para preparar un compuesto de Fórmula VIII, o una sal del mismo, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VI:

55



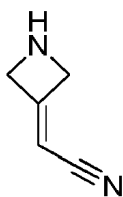
VI

60

con un compuesto de fórmula X:

65

5



X

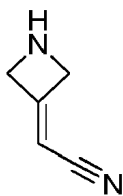
10

o una sal del mismo, en presencia de un agente reductor.

15

También se describen procesos de preparación de un compuesto de Fórmula III, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula X:

20

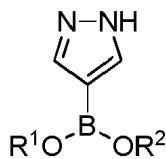


X

25

o una sal del mismo, con un compuesto de Fórmula IX:

30



IX

35

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula III, o una sal del mismo; en el que:

40

R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} ; o

R^1 y R^2 , junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C_{1-4} .

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45

En varios lugares de la presente especificación, los sustituyentes de los compuestos de la invención se divulgan en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la invención incluya todas y cada una de las subcombinaciones de los miembros de dichos grupos e intervalos. Por ejemplo, se pretende específicamente que el término "alquilo C_{1-6} " divulgue individualmente metilo, etilo, alquilo C_3 , alquilo C_4 , alquilo C_5 , y alquilo C_6 .

50

Se aprecia además que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

55

El término "n miembros", donde n es un número entero, describe típicamente el número de átomos que forman el anillo en una fracción donde el número de átomos que forman el anillo es n. Por ejemplo, piperidinilo es un ejemplo de un anillo heterocicloalquilo de 6 miembros y 1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno es un ejemplo de un grupo cicloalquilo de 10 miembros.

60

Para los compuestos de la invención en los que una variable aparece más de una vez, cada variable puede ser una fracción diferente seleccionada independientemente del grupo que define la variable. Por ejemplo, cuando se describe una estructura que tiene dos grupos R que están presentes simultáneamente en el mismo compuesto, los dos grupos R pueden representar diferentes fracciones seleccionadas independientemente del grupo definido para R.

65

Como se usa en la presente, la frase "opcionalmente sustituido" significa no sustituido o sustituido. Como se usa en la presente, el término "sustituido" significa que un átomo de hidrógeno se elimina y se reemplaza por un sustituyente. Se entiende que la sustitución en un átomo dado está limitada por la valencia.

5 Como se usa en la presente, el término "alquilo", empleado solo o en combinación con otros términos, se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que puede ser de cadena lineal o ramificada. En algunas realizaciones, el grupo alquilo contiene de 1 a 12, de 1 a 8, o de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de fracciones alquilo incluyen, pero no están limitados a, grupos químicos como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo; homólogos superiores como 2-metil-1-butilo, *n*-pentilo, 3-pentilo, *n*-hexilo, 1,2,2-trimetilpropilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, y similares. En algunas realizaciones, la fracción alquilo es metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo o 2,4,4-trimetilpentilo. En algunas realizaciones, la fracción alquilo es metilo.

15 Como se usa en la presente, los términos "halo" y "halógeno", empleados solos o en combinación con otros términos, se refieren a flúor, cloro, bromo y yodo. En algunas realizaciones, halo es cloro, bromo o yodo. En algunas realizaciones, halo es cloro.

20 Como se usa en la presente, "heterocicloalquilo" se refiere a un anillo monocíclico no aromático que incluye grupos alquilo o alqueno ciclados en los que uno o más de los átomos de carbono que forman el anillo se reemplazan por un heteroátomo como un átomo de O, N, S o B.

25 Los procesos descritos en la presente pueden monitorizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto puede monitorizarse por medios espectroscópicos, como espectroscopia de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C), espectroscopia infrarroja, o espectrofotometría (por ejemplo, visible por UV); o por cromatografía como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina (TLC) u otras técnicas relacionadas.

30 Como se usa en la presente, el término "reaccionar" se usa como se conoce en la técnica y se refiere generalmente a juntar reactivos químicos de tal manera que se permita su interacción a nivel molecular para lograr una transformación química o física. En algunas realizaciones, la reacción implica dos reactivos, en donde se usan uno o más equivalentes de segundo reactivo con respecto al primer reactivo. Los pasos de reacción de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo durante un tiempo y bajo condiciones adecuadas para preparar el producto identificado.

35 La preparación de compuestos puede implicar la protección y desprotección de varios grupos químicos. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados pueden ser fácilmente determinadas por alguien experto en la técnica. La química de los grupos protectores puede encontrarse, por ejemplo, en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los ajustes a los grupos protectores y los métodos de formación y escisión descritos en la presente pueden ajustarse como sea necesario a la luz de los varios sustituyentes.

45 Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo en solventes adecuados que pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los productos intermedios, o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, por ejemplo, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo del paso de la reacción particular, se pueden seleccionar solventes adecuados para un paso de la reacción particular. En algunas realizaciones, las reacciones pueden llevarse a cabo en ausencia de solvente, como cuando por lo menos uno de los reactivos es un líquido o gas.

55 Los solventes adecuados pueden incluir solventes halogenados como tetracloruro de carbono, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano, α,α,α -trifluorotolueno, 1,2-dicloroetano, 1,2-dibromoetano, hexafluorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,2-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, mezclas de los mismos y similares.

60 Los solventes de éter adecuados incluyen: dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, dietil éter, etilenglicol dimetil éter, etilenglicol dietil éter, dietilenglicol dimetil éter, dietilenglicol dietil éter, trietilenglicol dimetil éter, anisol, *t*-butil metil éter, mezclas de los mismos y similares.

65 Los solventes prácticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, agua, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilenglicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol *i*-butilico, alcohol *t*-butilico, 2-etoxietanol, dietilenglicol, 1-, 2- o 3-pentanol, alcohol neo-pentílico,

alcohol t-pentílico, dietilenglicol monometil éter, dietilenglicol monoetil éter, ciclohexanol, alcohol bencílico, fenol o glicerol.

Los solventes apróticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, propionitrilo, formiato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetato de etilo, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, tetrametilurea, nitrometano, nitrobenzono, o hexametilfosforamida.

Los solventes hidrocarbonados adecuados incluyen benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o- o p-xileno, octano, indano, nonano, o naftaleno.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo a temperaturas apropiadas que pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica. Las temperaturas de reacción dependerán, por ejemplo, de los puntos de fusión y ebullición de los reactivos y solventes, si los hay; la termodinámica de la reacción (por ejemplo, puede ser necesario llevar a cabo las reacciones vigorosamente exotérmicas a temperaturas reducidas); y la cinética de la reacción (por ejemplo, una barrera de energía de activación alta puede necesitar temperaturas elevadas). "Temperatura elevada" se refiere a temperaturas por encima de la temperatura ambiente (aproximadamente 22° C).

Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo en aire o bajo una atmósfera inerte. Típicamente, las reacciones que contienen reactivos o productos que son sustancialmente reactivos con el aire pueden llevarse a cabo usando técnicas sintéticas sensibles al aire que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la preparación de compuestos puede implicar la adición de ácidos o bases para afectar, por ejemplo, a la catálisis de una reacción deseada o a la formación de formas de sal como sales de adición de ácido.

Los ácidos ejemplares pueden ser ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido nítrico. Los ácidos orgánicos incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butanoico, ácido benzoico, ácido 4-nitrobenzoico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido tartárico, ácido trifluoroacético, ácido propiólico, ácido butírico, ácido 2-butinoico, ácido vinil acético, ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico y ácido decanoico.

Las bases ejemplares incluyen hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y bicarbonato de sodio. Algunos ejemplos de bases fuertes incluyen, pero no están limitadas a, hidróxido, alcóxidos, amidas metálicas, hidruros metálicos, dialquilamidas y arilaminas metálicas, en donde; los alcóxidos incluyen sales de litio, sodio y potasio de óxidos de metilo, etilo y t-butilo; amidas las metálicas incluyen amida de sodio, amida de potasio y amida de litio; los hidruros metálicos incluyen hidruro de sodio, hidruro de potasio e hidruro de litio; y las dialquilamidas metálicas incluyen sales de sodio y potasio de amidas sustituidas con metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, trimetilsililo y ciclohexilo.

Los productos intermedios y los productos también pueden incluir sales de los compuestos divulgados en la presente. Como se usa en la presente, el término "sal" se refiere a una sal formada por la adición de un ácido o base aceptable a un compuesto divulgado en la presente. En algunas realizaciones, las sales son sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en la presente, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es aceptable para su uso en aplicaciones farmacéuticas desde una perspectiva toxicológica y que no interactúa adversamente con el ingrediente activo. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las mono- y bi-sales, incluyen, pero no están limitadas a, las derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos, como, pero no limitados a, acéticos, lácticos, cítricos, cinámicos, tartáricos, succínicos, fumáricos, maleicos, malónicos, mandélicos, málicos, oxálicos, propiónicos, clorhídricos, bromhídricos, fosfóricos, nítricos, sulfúricos, glicólicos, pirúvicos, metanosulfónicos, etanosulfónicos, toluensulfónicos, salicílicos, benzoicos y ácidos aceptables igualmente conocidos. Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Tras llevar a cabo la preparación de compuestos de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente, pueden usarse las operaciones de aislamiento y purificación habituales como concentración, filtración, extracción, extracción en fase sólida, recristalización, cromatografía y similares, para aislar los productos deseados.

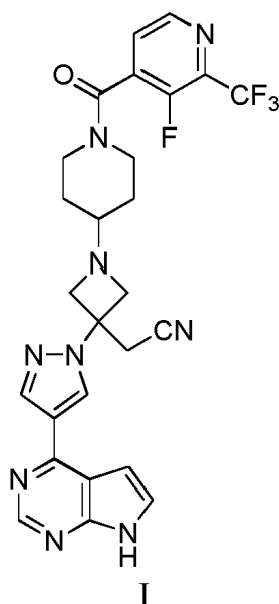
En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente y las sales de los mismos, están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto está por lo menos parcial o

sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la invención. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen por lo menos aproximadamente el 50%, por lo menos aproximadamente el 60%, por lo menos aproximadamente el 70%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 90%, por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 97%, o por lo menos aproximadamente el 99% en peso del compuesto de la invención, o una sal del mismo. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.

Los procesos para preparar algunos de los productos intermedios pueden encontrarse en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/531.896, presentada el 7 de septiembre de 2011, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 12/687.623, presentada el 14 de enero de 2010 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 13/043.986, presentada el 9 de marzo de 2011 .

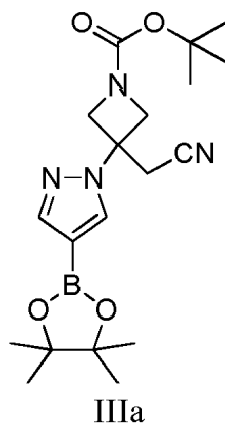
PROCESOS Y PRODUCTOS INTERMEDIOS

La presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I:



o una sal del mismo, que comprende:

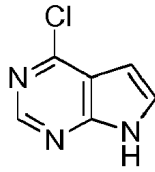
hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IIIa:



17

con un compuesto de Fórmula IVa:

5

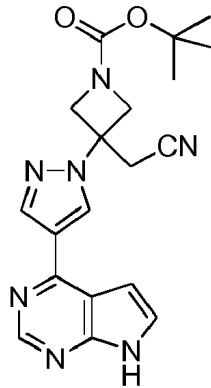


IVa

10

bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula IIa:

15



20

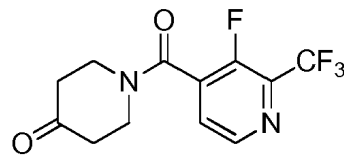
25

IIa;

30

desproteger el compuesto de Fórmula IIa por reacción con ácido clorhídrico para formar sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo; y hacer reaccionar la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo con un compuesto de fórmula VI:

35



40

VI

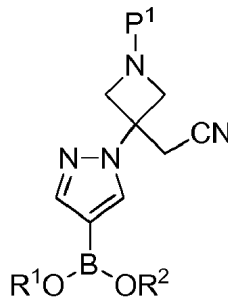
en presencia de un agente reductor para formar un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo.

45

En la presente también se describen, entre otros, procesos y productos intermedios para elaborar el compuesto de Fórmula I. Por consiguiente, en la presente se divulga un proceso que comprende:

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula III:

50



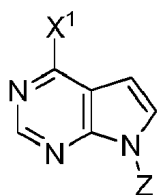
55

60

III

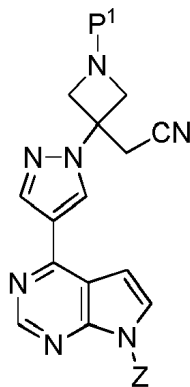
con un compuesto de Fórmula IV:

65



IV

bajo las condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula II:



II

en el que:

Z es H o un grupo protector;

P¹ es un grupo protector;

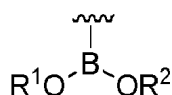
X¹ es halo; y

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o

R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

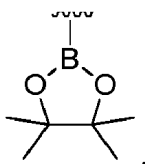
En algunas realizaciones, P¹ es terc-butoxicarbonilo. Los grupos protectores P¹ apropiados incluyen, pero no están limitados a los grupos protectores para aminas delineadas en Wuts y Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª ed., John Wiley & Sons: Nueva Jersey, páginas 696-887 (y, en particular, las páginas 872-887) (2007). En algunas realizaciones, P¹ es benciloxicarbonilo (Cbz), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo (Teoc), 2-(4-trifluorometilfenilsulfonil)etoxicarbonilo (Tsc), t-butoxicarbonilo (BOC), 1-adamtiloxicarbonilo (Adoc), 2-adamantilcarbonilo (2-Adoc), 2,4-dimetilpent-3-ioxycarbonilo (Doc), ciclohexiloxicarbonilo (Hoc), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (TcBOC), vinilo, 2-cloroetilo, 2-fenilsulfonietilo, alilo, bencilo, 2-nitrobencilo, 4-nitrobencilo, difenil-4-piridilmetilo, N',N'-dimetilhidrazinilo, metoximetilo, t-butoximetilo (Bum), benciloximetilo (BOM), o 2-tetrahidropiraniilo (THP). En algunas realizaciones, P¹ es tri(alquilo C₁₋₄)sililo (por ejemplo, tri(isopropil)sililo). En algunas realizaciones, P¹ es 1,1-dietoximetil. En algunas realizaciones, P¹ es 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEM). En algunas realizaciones, P¹ es N-pivaloiloximetilo (POM).

En algunas realizaciones,



es

5



10

En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son cada uno independientemente metilo o etilo. En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son cada uno metilo. En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son cada uno etilo.

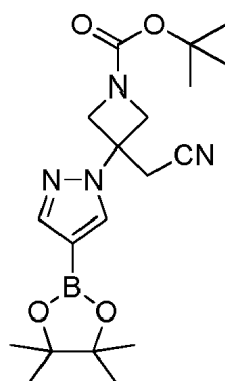
En algunas realizaciones, X^1 es cloro.

15

En algunas realizaciones, Z es H.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula III tiene la Fórmula IIIa:

20



25

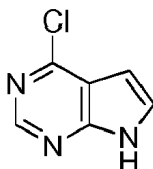
30

IIIa.

35

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula IV tiene la Fórmula IVa:

40



IVa.

45

En algunas realizaciones, las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula III, el compuesto de Fórmula IV, un catalizador de acoplamiento de Suzuki, una base y un componente solvente.

50

La reacción de acoplamiento de Suzuki en los procesos descritos en la presente puede iniciarse usando una serie de catalizadores de Suzuki conocidos diferentes, incluyendo catalizadores de paladio (0) y paladio (II) y realizarse bajo condiciones conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Miyaura y Suzuki, Chem. Rev. 1995, 95, 2457-2483). En algunas realizaciones, "en presencia de un catalizador" puede referirse a la adición de un precursor de catalizador, que está presente en alguna otra forma durante el ciclo de reacción. En algunas realizaciones, el catalizador de paladio es $Pd(PPh_3)_4$ y $Pd(dppf)_2Cl_2$. En algunas realizaciones, el catalizador es [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II). En algunas realizaciones, el catalizador de paladio es [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II) ("Pd-127"), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), o tetrakis(tri(o-tolilo)fosfina)paladio (0). En algunas realizaciones, el catalizador de paladio es tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0). En algunas realizaciones, la carga de catalizador de paladio es de aproximadamente 1×10^{-4} a aproximadamente 0,1 equivalentes. En algunas realizaciones, la carga de catalizador de paladio es de aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,0015 equivalentes.

60

65

En algunas realizaciones, la base es fluoruro de cesio. En algunas realizaciones, el fluoruro de cesio está presente en 3 equivalentes o más (por ejemplo, 3,5 equivalentes) en base al compuesto de Fórmula IV. En algunas realizaciones, el componente solvente puede incluir *tert*-butanol y agua. En algunas realizaciones, el *tert*-butanol y el agua están presentes en una relación de volumen de 1:1.

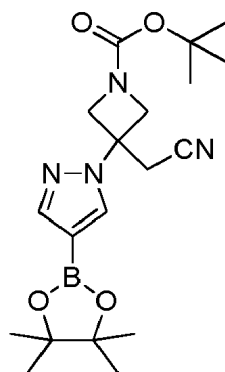
En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula III y IV están presentes en aproximadamente una relación molar de 1:1.

5 En algunas realizaciones, el componente solvente comprende agua y un solvente orgánico. En algunas realizaciones, el solvente orgánico es 1,4-dioxano, 1-butanol, t-butanol, 1,2-dimetoxietano (DME), DMF, 2-propanol, tolueno o etanol, o una combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, la base es una base inorgánica. En algunas realizaciones, la base es una base orgánica. En algunas realizaciones, la base es un carbonato de metal alcalino (por ejemplo, K_2CO_3 o Na_2CO_3). En algunas realizaciones, la base es carbonato de potasio (K_2CO_3) o CsF. En algunas realizaciones, se usan de dos a cinco equivalentes de base (por ejemplo, K_2CO_3 , CsF).

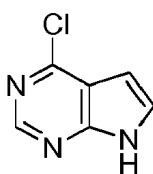
15 En algunas realizaciones, la reacción de acoplamiento de Suzuki se realiza a una temperatura de aproximadamente $80^\circ C$ a aproximadamente $100^\circ C$. En algunas realizaciones, la reacción se lleva a cabo durante de dos a doce horas. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula II o IIa puede aislarse opcionalmente del preparado acuoso de la mezcla de la reacción de acoplamiento de Suzuki o puede usarse directamente.

20 En otro aspecto, el proceso de la presente invención incluye el paso de elaborar un compuesto de Fórmula IIa, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IIIa:



IIIa

40 con un compuesto de Fórmula IVa:



IVa

50 bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula IIa:

55

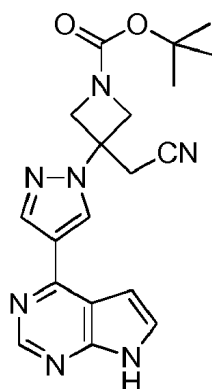
60

65

5

10

15



IIa

20

en donde las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula IIIa, el compuesto de Fórmula IVa, [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II), fluoruro de cesio, y un componente solvente, en donde el componente solvente comprende agua y *terc*-butanol.

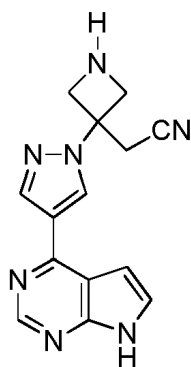
25

Los procesos para elaborar un compuesto de Fórmula II o IIa pueden comprender además desproteger el compuesto de Fórmula II para formar un compuesto de Fórmula V:

30

35

40



V

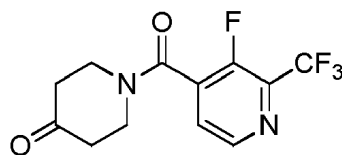
45

o sal del mismo. La desprotección puede incluir hacer reaccionar el compuesto de Fórmula II o Fórmula IIa con ácido clorhídrico (por ejemplo, ácido clorhídrico aproximadamente 5 M) en un segundo componente solvente (por ejemplo, agua y diclorometano). En algunas realizaciones, el ácido clorhídrico se usa en una cantidad de 5 a 8 equivalentes en base al compuesto de Fórmula II. Como se usa en la presente, "segundo" en la frase "segundo componente solvente" se usa para diferenciar el componente solvente de otros componentes solventes usados en pasos anteriores o posteriores del proceso y no indica que deben estar presentes dos solventes.

50

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula V, o una sal del mismo, se hace reaccionar adicionalmente con un compuesto de Fórmula VI:

55



VI

60

en presencia de un agente reductor para formar un compuesto de Fórmula I:

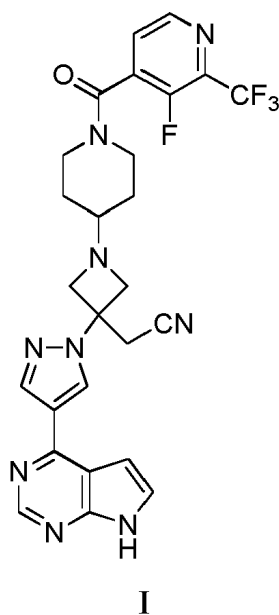
65

5

10

15

20



25

o una sal del mismo.

30

En algunas realizaciones, el agente reductor es cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio. En algunas realizaciones, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. En algunas realizaciones, se usa más de 1 equivalente (por ejemplo, 2 equivalentes) de triacetoxiborohidruro de sodio en base al compuesto de Fórmula V.

35

40

45

50

El agente reductor puede ser cualquier agente reductor adecuado para su uso en aminación reductora, incluyendo varios agentes reductores de borohidruro y borano, como los de Ellen W. Baxter y Allen B. Reitz, *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents*, Organic Reactions, Capítulo 1, páginas 1-57 (Wiley, 2002), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Las clases no limitativas de agentes reductores apropiados incluyen borohidruro, cianoborohidruro, tri(acilo C₁₋₄)oxiborohidruro (por ejemplo, derivados de triacetoxiborohidruro), hidruro de 9-borobiciclo[3.3.1]nonano, tri(alquilo C₁₋₄)borohidruro, y derivados de disopinocampteilcianoborohidruro, amino boranos, complejo borano-piridina y boranos de alquilamina. Ejemplos no limitativos de agentes reductores apropiados incluyen cianoborohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, hidruro de ciano-9-borobiciclo[3.3.1]nonano, cianoborohidruro de tetrabutilamonio, cianoborohidruro en un soporte sólido, triacetoxiborohidruro de tetrametilamonio, triacetoxiborohidruro de sodio, trietilborohidruro de litio, tri(sec-butil)borohidruro de litio, disopinocampteilcianoborohidruro de sodio, catecol borano, tetrahidrofurano de borano, borohidruro de sodio, borohidruro de potasio, borohidruro de litio, paladio en presencia de gas de hidrógeno, 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB), 2-picolino borano o triacetoxiborohidruro soportado por polímero. En algunas realizaciones, cualquiera de los anteriormente mencionados, y preferiblemente el cianoborohidruro de sodio, se usa en combinación con un aditivo de titanio (IV), un agente deshidratante, o un aditivo de haluro de zinc. En algunas realizaciones, el agente reductor es un cianoborohidruro o triacetoxiborohidruro de tetra(alquilo C₁₋₄)amonio, un cianoborohidruro de metal alcalino, o un cianoborohidruro o triacetoxiborohidruro alcalinotérreo. En algunas realizaciones, el agente reductor es un cianoborohidruro de metal alcalino. En algunas realizaciones, el agente reductor se selecciona de cianoborohidruro de sodio y triacetoxiborohidruro de sodio. En algunas realizaciones, el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio. Como se usa en la presente, un aditivo de titanio (IV) es un ácido de Lewis que contiene un metal de titanio (IV) (por ejemplo, tetracloruro de titanio, isopropóxido de titanio, etóxido de titanio y similares).

55

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula V, o una sal del mismo, es sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidina-3-il)acetoneitrilo. En algunas realizaciones, la reacción se lleva a cabo en presencia de por lo menos dos equivalentes de una segunda base. En algunas realizaciones, la segunda base es una amina terciaria (por ejemplo, trietilamina). Como se usa en la presente, "segunda" en la frase "segunda base" se usa para diferenciar la base de otras bases usadas en pasos anteriores o posteriores del proceso y no indica que deben estar presentes dos bases.

60

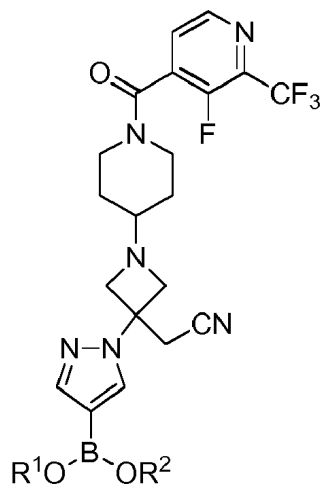
En algunas realizaciones, se usa más de 1 equivalente del compuesto de Fórmula VI en base al compuesto de Fórmula V, o una sal del mismo.

65

En algunas realizaciones, la reacción de un compuesto de Fórmula V, o sal del mismo, con un compuesto de Fórmula VI se realiza en un solvente de diclorometano.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además hacer reaccionar el compuesto de Fórmula I con ácido adípico para formar la sal de adipato del compuesto de Fórmula I

En la presente también se describe un compuesto de Fórmula VII:



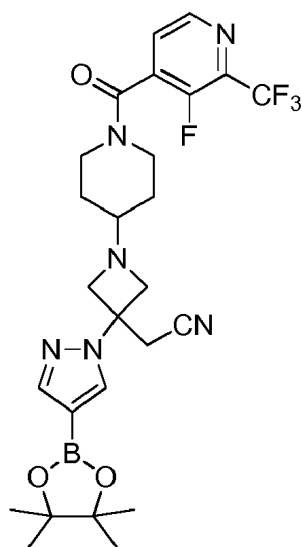
VII

o una sal del mismo; en el que:

30

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula VII es un compuesto que tiene Fórmula VIIa:

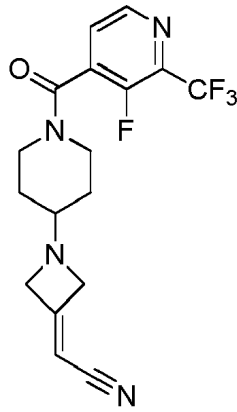


VIIa

o una sal del mismo.

En la presente también se describe un proceso para preparar un compuesto de Fórmula VII, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VIII:

5



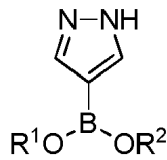
10

15

VIII

con un compuesto de fórmula IX:

20



25

IX

30

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula VII; en el que:

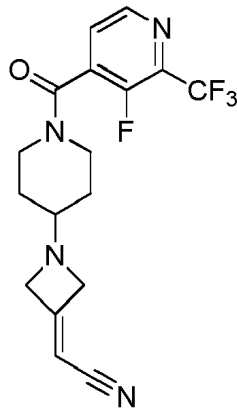
R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o

R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

35

En algunas realizaciones, el proceso incluye un proceso para elaborar un compuesto de Fórmula VIIa que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VIII:

40



45

50

55

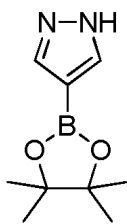
VIII

con un compuesto de Fórmula IXa:

60

65

5

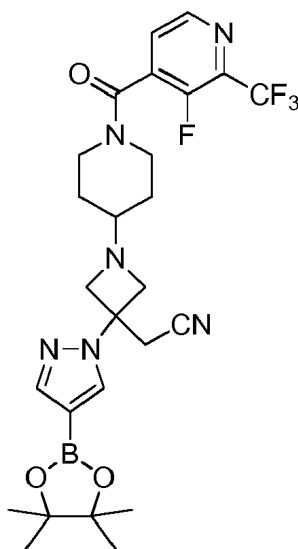


10

IXa

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula VIIa:

15



20

25

30

35

VIIa.

40

En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento para la reacción de un compuesto de Fórmula VIII, con un compuesto de Fórmula IX o un compuesto de Fórmula IXa, es 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undeceno. En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,05 a aproximadamente 1,2 equivalentes (por ejemplo, 1,12 equivalentes) de agente de acoplamiento en base al compuesto de Fórmula VIII.

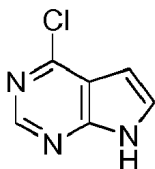
45

En algunas realizaciones, la reacción del compuesto de Fórmula VIII con el compuesto de Fórmula IX o IXa se realiza en un componente solvente que comprende acetonitrilo, a una temperatura de aproximadamente 40° C a aproximadamente 60° C. En algunas realizaciones, se usan de 1 a 1,2 equivalentes del compuesto de Fórmula IX o IXa en base al compuesto de Fórmula VIII.

50

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula VIIa se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula IVa:

55



IVa

60

bajo las condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula I:

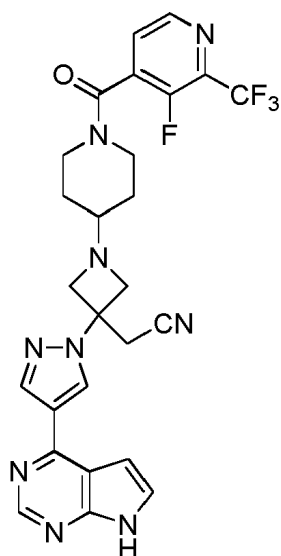
65

5

10

15

20



I

25

en el que las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula VIIa, el compuesto de Fórmula IVa, un catalizador de acoplamiento de Suzuki, una base y un segundo componente solvente.

30

En algunas realizaciones, el catalizador de Suzuki es tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0). En algunas realizaciones, la base (por ejemplo, bicarbonato de sodio) está presente en 4 equivalentes o más (por ejemplo, 5 equivalentes) en base al compuesto de Fórmula VII o VIIa.

35

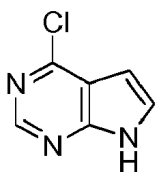
En algunas realizaciones, el segundo componente solvente comprende 1,4-dioxano y agua, por ejemplo, una relación en volumen de 1:1.

En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula VII o VIIa, y IVa, están presentes en aproximadamente una relación molar de 1:1.

40

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula VIIa se hace reaccionar con un compuesto de Fórmula IVa:

45



IVa

50

bajo las condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula I:

55

60

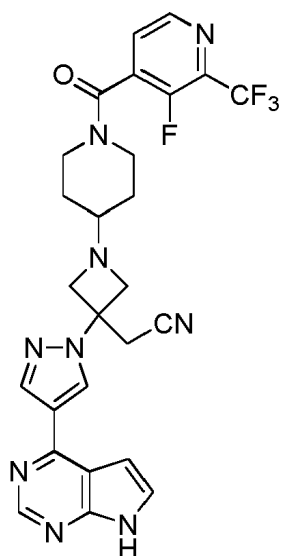
65

5

10

15

20



I

25 en donde las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula VIIa, el compuesto de Fórmula IVa, tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), bicarbonato de sodio, y un segundo componente solvente, en donde el segundo componente solvente comprende agua y 1,4-dioxano.

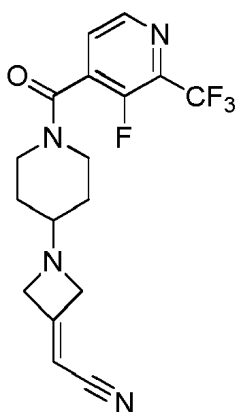
30

También se describe en la presente un compuesto de Fórmula VIII:

35

40

45



VIII

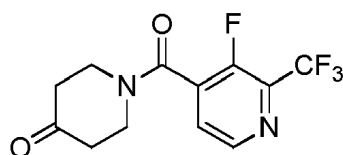
50

o una sal del mismo.

En la presente también se describe un proceso para preparar un compuesto de Fórmula VIII, o una sal del mismo, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VI:

55

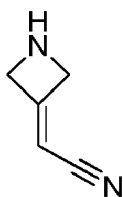
60



VI

65

con un compuesto de fórmula X:



X

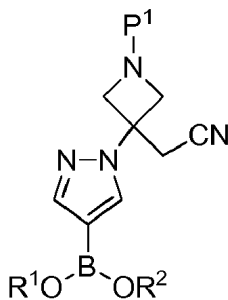
o una sal del mismo, en presencia de un agente reductor.

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula X, o una sal del mismo, es clorhidrato de 2-(azetidin-3-ilideno)acetonitrilo.

En algunas realizaciones, hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VI y un compuesto de Fórmula X, o una sal del mismo, es en presencia de un agente reductor como cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio (por ejemplo, triacetoxiborohidruro de sodio). Pueden usarse de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 equivalentes (por ejemplo, 2 equivalentes) del agente reductor en base al compuesto de Fórmula X, o una sal del mismo.

En algunas realizaciones, reaccionar el compuesto de Fórmula VI y el compuesto de Fórmula X, o una sal del mismo, se realiza en un componente solvente que comprende diclorometano.

También se describe en la presente un compuesto de Fórmula III:

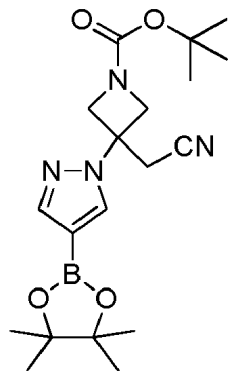


III

o una sal del mismo; en el que:

R^1 y R^2 son cada uno independientemente H o alquilo C_{1-6} ; o R^1 y R^2 , junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C_{1-4} .

En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula III es un compuesto que tiene Fórmula IIIa:

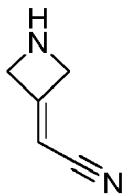


IIIa

o una sal del mismo.

También se describe un proceso para preparar un compuesto de Fórmula III, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula X:

5



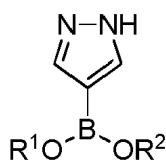
10

X

15

o una sal del mismo, con un compuesto de Fórmula IX:

20



25

IX

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula III, o una sal del mismo; en el que:

30

R¹ y R² son cada uno independientemente H o alquilo C₁₋₆; o R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que están unidos y el átomo de boro al que están unidos los átomos de oxígeno, forman un anillo heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros, que está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, o 4 grupos alquilo C₁₋₄.

35

En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento usado para hacer reaccionar un compuesto de Fórmula X, o sal del mismo, con un compuesto de Fórmula IX es 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undeceno. En algunas realizaciones, se usan de 0,1 a 0,2 equivalentes de agente de acoplamiento en base al compuesto de Fórmula X, o sal del mismo.

40

En algunas realizaciones, la reacción del compuesto de Fórmula X, o sal del mismo, con el compuesto de Fórmula IX se realiza en un componente solvente que comprende alcohol isopropílico, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 70° C a aproximadamente 90° C.

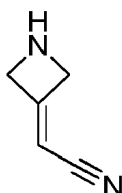
45

En algunas realizaciones, se usan de 1 a 1,1 equivalentes del compuesto de Fórmula IX en base al compuesto de Fórmula X, o sal del mismo.

50

En otro aspecto más, el proceso de la presente invención puede incluir un proceso para preparar un compuesto de Fórmula IIIa, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula X:

55

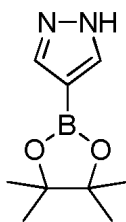


X

60

con un compuesto de Fórmula IXa:

65



IXa

en presencia de un agente de acoplamiento para formar un compuesto de Fórmula III.

En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento usado para hacer reaccionar un compuesto de Fórmula X con un compuesto de Fórmula IXa es 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undeceno. En algunas realizaciones, se usan de 0,1 a 0,2 equivalentes de agente de acoplamiento en base al compuesto de Fórmula X.

En algunas realizaciones, la reacción del compuesto de Fórmula X con el compuesto de Fórmula IXa se realiza en un componente solvente que comprende alcohol isopropílico, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 70° C a aproximadamente 90° C.

En algunas realizaciones, se usan de 1 a 1,1 equivalentes del compuesto de Fórmula IXa en base al compuesto de Fórmula X.

Usos

Todas las referencias en lo sucesivo al compuesto de la invención y su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad asociada con JAK son aspectos de la divulgación y no forman parte de la invención reivindicada, que está dirigida al proceso para la preparación del presente compuesto de fórmula I como se define en las reivindicaciones.

El compuesto de Fórmula I, {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidín-3-il}acetonitrilo, es un inhibidor de JAK (por ejemplo, JAK1, JAK2). Los inhibidores de JAK son útiles en el tratamiento de varias enfermedades o trastornos asociados con JAK. Ejemplos de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades que involucran el sistema inmune, como por ejemplo el rechazo de trasplantes de órganos (por ejemplo, rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huésped). Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, diabetes tipo I, lupus, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, nefropatías por inmunoglobulina, miocarditis, trastornos de tiroides autoinmunes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y similares. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmune es un trastorno de la piel bullosa autoinmune como pénfigo vulgar (PV) o penfigoide buloso (PA).

Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen afecciones alérgicas como asma, alergias alimenticias, dermatitis eszematosa, dermatitis de contacto, dermatitis atópica (eccema atrópico) y rinitis. Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades virales como el virus de Epstein Barr (EBV), hepatitis B, hepatitis C, VIH, HTLV 1, virus Varicela-Zoster (VZV) y el virus del papiloma humano (HPV). Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas con JAK incluyen enfermedades asociadas con el ciclo del cartílago, por ejemplo, artritis gotosa, artritis séptica o infecciosa, artritis reactiva, distrofia simpática refleja, algodistrofia, síndrome de Tietze, atropatía costal, osteoartritis deformante endémica, enfermedad de Mseleni, enfermedad de Handigodu degeneración resultante de la fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, o espondilitis anquilosante.

Ejemplos adicionales de enfermedad asociada a JAK incluyen malformaciones congénitas del cartílago, incluyendo la clorrólisis hereditaria, la condrodisplasia y la pseudocondrodisplasia (por ejemplo, microtia, enotia y chondrodisplasia metafisaria).

Ejemplos adicionales de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen trastornos de la piel como psoriasis (por ejemplo, psoriasis vulgar), dermatitis atópica, erupción cutánea, irritación de la piel, sensibilización de la piel (por ejemplo, dermatitis de contacto o dermatitis de contacto alérgica). Por ejemplo, ciertas sustancias que incluyen algunos productos farmacéuticos cuando se aplican tópicamente pueden provocar sensibilización de la piel. En algunas realizaciones, la co-administración o la administración secuencial de por lo menos un inhibidor de JAK de la invención junto con el agente que provoca la sensibilización no deseada puede ser útil para tratar dicha sensibilización o dermatitis no deseada. En algunas realizaciones, el trastorno de la piel se trata mediante administración tópica de por lo menos un inhibidor de JAK de la invención.

Ejemplos adicionales de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen aquellas caracterizadas

por tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, glioblastoma, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman, leiomiomas uterino, melanoma, etc.), cánceres hematológicos (por ejemplo, linfoma, leucemia como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) o mieloma múltiple), y cáncer de piel como linfoma cutáneo de células T (CTCL) y linfoma cutáneo de células B. Ejemplos de CTCL incluyen el síndrome de Sezary y la micosis fungoide. Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen la hipertensión arterial pulmonar.

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen los cánceres asociados a la inflamación. En algunas realizaciones, el cáncer está asociado con enfermedad inflamatoria del intestino. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es la enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, el cáncer asociado a la inflamación es cáncer asociado a la colitis. En algunas realizaciones, el cáncer asociado a la inflamación es cáncer de colon o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), adenocarcinoma, cáncer de intestino delgado, o cáncer de recto.

Las enfermedades asociadas con JAK pueden incluir además aquellas caracterizadas por la expresión de: mutantes de JAK2 como los que tienen por lo menos una mutación en el dominio de pseudo-quinasa (por ejemplo, JAK2V617F); mutantes de JAK2 que tienen por lo menos una mutación fuera del dominio de pseudo-quinasa; mutantes de JAK1; mutantes de JAK3; mutantes del receptor de eritropoyetina (EPOR); o expresión desregulada de CRLF2.

Las enfermedades asociadas con JAK pueden incluir además trastornos mieloproliferativos (MPD) como policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE), mielofibrosis con metaplasia mieloide (MMM), mielofibrosis primaria (PMF), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena crónica (CMML), síndrome hipereosinofílico (HES), enfermedad de mastocitos sistémica (SMCD) y similares. En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis (por ejemplo, mielofibrosis primaria (PMF) o policitemia vera posterior/mielofibrosis trombocitemia esencial (Post-PV/Post-ET MF)). En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis trombocitemia post-esencial (Post-ET MF). En algunas realizaciones, el trastorno mieloproliferativo es mielofibrosis post policitemia vera (Post-PV MF).

Otros ejemplos de enfermedades o afecciones asociadas con JAK incluyen mejorar los efectos secundarios dermatológicos de otros productos farmacéuticos mediante la administración del compuesto de la invención. Por ejemplo, numerosos agentes farmacéuticos dan como resultado reacciones alérgicas no deseadas que pueden manifestarse como erupción acneiforme o dermatitis relacionada. Los agentes farmacéuticos ejemplares que tienen tales efectos secundarios indeseables incluyen fármacos anticancerosos tales como gefitinib, cetuximab, erlotinib y similares. Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía sistémica o tópica (por ejemplo, localizada cerca de la dermatitis) en combinación con (por ejemplo, simultánea o secuencialmente) el agente farmacéutico que tiene el efecto secundario dermatológico indeseable. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención puede administrarse tópicamente junto con uno o más productos farmacéuticos diferentes, mientras que los otros productos farmacéuticos cuando se aplican tópicamente en ausencia de un compuesto de la invención causan dermatitis de contacto, sensibilización al contacto alérgica o un trastorno cutáneo similar. Por consiguiente, las composiciones de la invención incluyen formulaciones tópicas que contienen el compuesto de la invención y un agente farmacéutico adicional que puede provocar dermatitis, trastornos de la piel, o efectos secundarios relacionados.

Enfermedades asociadas con JAK adicionales incluyen inflamación y enfermedades inflamatorias. Ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen sarcoidosis, enfermedades inflamatorias del ojo (por ejemplo, iritis, uveítis, escleritis, conjuntivitis, o enfermedades relacionadas), enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio (por ejemplo, el tracto respiratorio superior incluyendo la nariz y los senos nasales, como rinitis o sinusitis o el tracto respiratorio inferior, incluyendo bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y similares), miopatía inflamatoria como miocarditis y otras enfermedades inflamatorias. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del ojo es la blefaritis.

Enfermedades adicionales asociadas con JAK incluyen lesiones por reperusión de isquemia o una enfermedad o afección relacionada con un evento isquémico inflamatorio como una apoplejía o un paro cardíaco, un estado patológico inducido por endotoxinas (por ejemplo, complicaciones después de una cirugía de derivación o estados de endotoxinas crónicas que contribuyen a una insuficiencia cardíaca crónica) anorexia, caquexia, fatiga como la resultante de o asociada con cáncer, reestenosis, esclerodermatitis, fibrosis, afecciones asociadas con hipoxia o astrogliosis como, por ejemplo, retinopatía diabética, cáncer, o neurodegeneración, y otras enfermedades inflamatorias como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y shock séptico.

Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen gota y aumento del tamaño de la próstata debido a, por ejemplo, hipertrofia prostática benigna o hiperplasia prostática benigna, así como enfermedades de resorción ósea como osteoporosis o osteoartritis, enfermedades de resorción ósea asociadas con: desequilibrio hormonal y/o terapia hormonal, enfermedad autoinmune (por ejemplo, sarcoidosis ósea) o cáncer (por ejemplo, mieloma).

Enfermedades asociadas con JAK adicionales incluyen un trastorno del ojo seco. Tal como se usa en la

presente, "trastorno del ojo seco" se pretende que abarque los estados de enfermedad resumidos en un informe oficial reciente del Dry Eye Workshop (DEWS), que definió el ojo seco como "una enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que da como resultado síntomas de molestia, trastornos visuales, e inestabilidad de la película lagrimal con daños potenciales en la superficie ocular. Se acompaña de una osmolaridad aumentada de la película lagrimal y de la inflamación de la superficie ocular". 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), 5 (2), 75-92 abril de 2007. En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco se selecciona entre un ojo seco deficiente en lágrimas (ADDE) o un trastorno del ojo seco evaporativo, o combinaciones apropiadas de los mismos. En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco es el síndrome de ojo seco de Sjogren (SSDE). En algunas realizaciones, el trastorno del ojo seco es síndrome de ojo seco no de Sjogren (NSSDE).

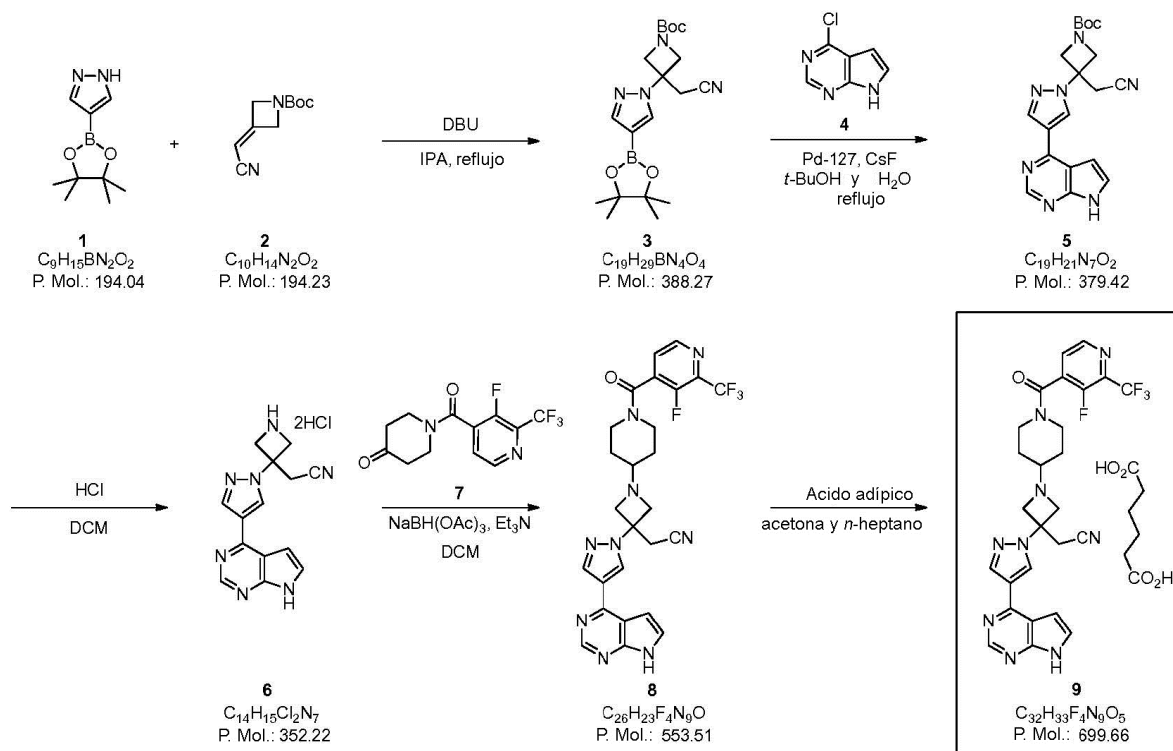
Enfermedades asociadas con JAK adicionales incluyen conjuntivitis, uveítis (incluyendo la uveítis crónica), corioditis, retinitis, ciclitis, escleritis, episcleritis o iritis. Otras enfermedades asociadas con JAK incluyen disfunción respiratoria o fallo asociado con infección viral, como la gripe y el SARS.

Ejemplos

La invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Síntesis de adipato de 2-(3-(4-(7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidina-3-il)acetonitrilo (9)

Esquema I



3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (3). A un matraz de 1 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, y un agitador mecánico se añadieron secuencialmente isopropanol (IPA, 200 ml), 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-eno (DBU, 9,8 g, 64,4 mmol, 0,125 equiv), 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1, 101 g, 520,51 mmol, 1,01 equiv) y 3-(cianometileno)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (2, 100 g, 514,85 mmol) a temperatura ambiente para generar una mezcla de la reacción como una suspensión. La mezcla de la reacción resultante se calentó a refluxo en 30 minutos para proporcionar una solución homogénea y la mezcla se mantuvo a refluxo durante 2-3 horas adicionales. Una vez que se completó la reacción según se monitorizó mediante HPLC, se añadió gradualmente *n*-heptano (400 ml) a la mezcla de la reacción en 45 minutos mientras se mantenía la mezcla a refluxo. Los sólidos se precipitaron durante la adición de *n*-heptano. Una vez que se completó la adición de *n*-heptano, la mezcla se enfrió gradualmente

a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora adicional. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con *n*-heptano (200 ml), y se secaron al vacío a 50° C con barrido de nitrógeno hasta un peso constante para proporcionar 3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**3**, 181 g, 199,9 g teóricos, 90,5%) como un sólido amarillo de pálido a blanco. Para **3**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 4.45 - 4.23 (m, 2H), 4.23 - 4.03 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.25 (s, 12H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.34, 145.50, 135.88, 116.88, 107.08 (br), 83.15, 79.36, 58.74 (br), 56.28, 27.96, 26.59, 24.63 ppm; C₁₉H₂₉BN₄O₄ (MW 388.27), LCMS (EI) *m/e* 389 (M⁺ + H).

3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (5**). A un matraz de 1 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, y un agitador mecánico se añadieron 4-cloro-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (**4**, 39,6 g, 257,6 mmol), 3-(cianometil)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**3**, 100 g, 257,6 mmol, 1,0 equiv.), fluoruro de cesio (136,9 g, 901,4 mmol, 3,5 equiv.), *tert*-butanol (250 ml), agua (250 ml) y [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II) (Pd-127, 351,4 mg, 0,46 mmol, 0,0018 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción resultante se desgasificó y se volvió a llenar con nitrógeno 3 veces antes de ser calentada a reflujo y se mantuvo a reflujo bajo nitrógeno durante 20-24 horas. Cuando la HPLC mostró que la reacción se había completado, la mezcla de la reacción se enfrió a 45-55° C en 30 minutos, se separaron las dos fases, y se descartó la fase acuosa. A la fase orgánica se le añadió *n*-heptano (125 ml) en 30 minutos a 45-55° C. La mezcla resultante se enfrió lentamente a temperatura ambiente en una hora y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con *n*-heptano (100 ml) y se secaron al vacío a 50° C con barrido de nitrógeno hasta peso constante para proporcionar 3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**5**, 96,8 g, 97,7 g teóricos, 99%) como un sólido amarillo pálido. Para **5**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.62 - 4.41 (m, 2H), 4.31 - 4.12 (m, 2H), 3.67 (s, 2H), 1.39 (s, 9H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.40, 152.60, 150.63, 149.15, 139.76, 129.53, 127.65, 122.25, 116.92, 113.21, 99.71, 79.45, 58.34 (br), 56.80, 27.99, 26.83 ppm; C₁₉H₂₁N₇O₂ (MW 379.4), LCMS (EI) *m/e* 380 (M⁺ + H).**

Sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidina-3-il)acetonitrilo (6**). A un matraz de 0,5 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, un embudo adicional, y un agitador mecánico se añadieron 3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-3-(cianometil)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**5**, 15 g, 39,5 mmol), agua (7,5 ml, 416 mmol) y diclorometano (75 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente para generar una suspensión. A la suspensión se le añadió una solución de cloruro de hidrógeno 5 M (HCl) en isopropanol (55 ml, 275 mmol, 7,0 equiv.) en 5 minutos. La mezcla de la reacción resultante se calentó luego a reflujo suave y se mantuvo a reflujo durante 3-4 horas. Después de que se completase la reacción como se monitorizó por HPLC, se añadió *tert*-butil metil éter (TBME, 45 ml) a la suspensión de reacción. La mezcla se enfrió gradualmente a temperatura ambiente y se agitó durante una hora adicional. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con *tert*-butil metil éter (TBME, 45 ml) y se secaron al vacío a 50° C con barrido de nitrógeno hasta peso constante para proporcionar sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidina-3-il)acetonitrilo (**6**, 13,6 g, 13,9 g teóricos, 98%) como un sólido de color blanquecino a amarillo claro. Para **6**: ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.96 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 4.74 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 3.74 (s, 2H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 151.35, 143.75, 143.33, 141.33, 132.03, 131.97, 115.90, 114.54, 113.85, 103.18, 59.72, 54.45 (2C), 27.02 ppm; C₁₄H₁₅Cl₂N₇ (C₁₄H₁₃N₇ para la base libre, MW 279.30), LCMS (EI) *m/e* 280 (M⁺ + H).**

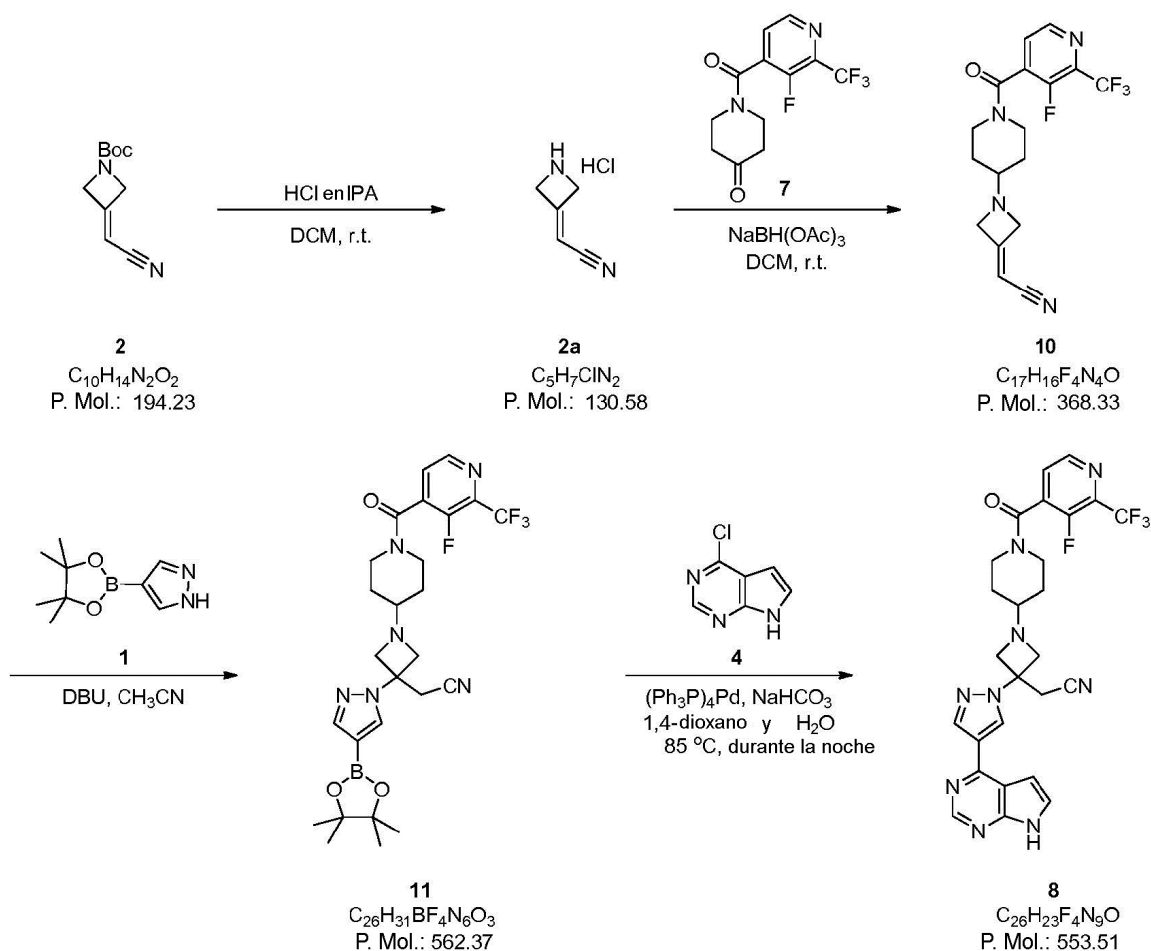
2-(3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidina-3-il)acetonitrilo (8**, Base libre). A un matraz de 0,5 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, un embudo adicional, y un agitador mecánico se añadieron sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)azetidina-3-il)acetonitrilo (**6**, 20 g, 56,78 mmol), diclorometano (200 ml) y trietilamina (TEA, 16,62 ml, 119,2 mmol, 2,1 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de que se añadiera a la mezcla 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-ona (**7**, 17,15 g, 57,91 mmol, 1,02 equiv.). La mezcla se trató luego con triacetoxiborohidruro de sodio (25,34 g, 113,6 mmol, 2,0 equiv.) En 5 minutos a temperatura ambiente (por debajo de 26° C). La mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de que la reacción se completase como se monitorizó por HPLC, la mezcla de la reacción se inactivó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ (200 ml). Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera al 4% (100 ml) seguido de un cambio de solvente de cloruro de metileno a acetona por destilación. La solución resultante del producto bruto deseado (**8**) en acetona se usó directamente para la posterior formación de sal de adipato. Una pequeña porción de la solución se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, 0-10% de MeOH en elución en gradiente de EtOAc) para proporcionar el 2-(3-(4-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1*H*-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidina-3-il)acetonitrilo analíticamente puro (**8** base libre) como un sólido blanquecino. Para **8**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) 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; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.28, (153.51, 150.86), 152.20, 150.94, 149.62, (146.30, 146.25), 139.48,**

(134.78, 134.61), (135.04, 134.92, 134.72, 134.60, 134.38, 134.26, 134.03, 133.92), 129.22, 127.62, 126.84, 121.99, 122.04, (124.77, 122.02, 119.19, 116.52), 117.39, 113.00, 99.99, 61.47, 60.49, 57.05, 44.23, 28.62, 27.88, 27.19 ppm; $C_{26}H_{23}F_4N_9O$ (MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.1 ($M^+ + H$).

5 **Adipato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetonitrilo (9).** A un matraz de 0,5 l equipado con un agitador mecánico, un termopar, un embudo de adición, y una entrada de nitrógeno, se añadió una solución de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetonitrilo bruto (8 base libre, 31,38 g, 56,7 mmol) en acetona (220 ml) y ácido adípico (8,7 g, 59,53 mmol, 1,05 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se calentó luego a reflujo para dar una solución. Se añadió gradualmente *n*-heptano (220 ml) a la mezcla de la reacción a 40-50° C en una hora. La mezcla resultante se enfrió gradualmente a temperatura ambiente en una hora y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con *n*-heptano (2 x 60 ml) y se secaron al vacío a 50° C con barrido con nitrógeno hasta peso constante para proporcionar adipato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetonitrilo (9, 34,0 g, 39,7 g teóricos, 85,6% para dos pasos) como un sólido de blanco a blanquecino. 9: N^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) 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, $DMSO-d_6$) 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; $C_{32}H_{33}F_4N_9O_5$ (MW 699.66; $C_{26}H_{23}F_4N_9O$ para base libre, MW, 553.51), LCMS (EI) m/e 554.0 ($M^+ + H$).

Ejemplo de referencia 2: Síntesis alternativa de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetonitrilo

Esquema II



Clorhidrato de 2-(azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (2a). A un matraz de 0,5 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, y un agitador mecánico se añadieron 3-(cianometileno)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (**2**, 30 g, 154,46 mmol) y cloruro de metileno (300 ml) a temperatura ambiente. La solución se trató luego con una solución de cloruro de hidrógeno 5 M (HCl) en solución de isopropanol (294,2 ml, 1,54 mol, 10 equiv.) a temperatura ambiente y la mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Una vez que se completó la reacción según se monitorizó mediante HPLC, la suspensión se añadió *tert*-butil metil éter (TBME, 150 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con *n*-heptano (2 X 100 ml) y se secaron en el embudo de filtración a temperatura ambiente durante 3 horas para proporcionar clorhidrato de 2-(azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (**2a**, 13,7 g, 20,2 g teóricos, 67,8%) como un sólido blanco. Para **2a**: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (s, 2H), 5.94 (p, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.85 - 4.80 (m, 2H), 4.77 - 4.71 (m, 2H) ppm; ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.65, 114.54, 94.78, 55.26, 54.63 ppm; C₅H₇ClN₂ (MW 130.58; C₅H₆N₂ para base libre, MW 94.11), LCMS (EI) *m/e* 95 (M⁺ + H).

2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (10). A un matraz de 0,25 l equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, y un agitador magnético se añadieron clorhidrato de 2-(azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (**2a**, 4,5 g, 34,46 mmol), 1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-ona (**7**, 10 g, 34,46 mmol, 1.0 equiv.) y cloruro de metileno (100 ml) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se trató con triacetoxiborohidruro de sodio (14,6 g, 68,93 mmol, 2.0 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas antes de ser inactivada con bicarbonato de sodio saturado (NaHCO₃), solución acuosa (50 ml). Las dos fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (200 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml) y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto bruto deseado (**10**), que se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, acetato de etilo al 0-10% en elución en gradiente de hexano) para proporcionar 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (**10**, 9,5 g, 12,7 g teóricos 74,8%) como un sólido blanco. Para **10**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H), 5.29 (p, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.18 - 4.08 (m, 1H), 4.08 - 4.03 (m, 2H), 3.98 - 3.94 (m, 2H), 3.57 - 3.39 (m, 2H), 3.17 - 3.04 (m, 1H), 2.56 (tt, *J* = 7.4, 3.5 Hz, 1H), 1.86 - 1.77 (m, 1H), 1.75 - 1.64 (m, 1H), 1.54 - 1.43 (m, 1H), 1.43 - 1.31 (m, 1H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.34, 160.73, 152.62 (d, *J* = 269.1 Hz), 145.75 (d, *J* = 6.1 Hz), 136.73 (qd, *J* = 36.1, 12.0 Hz), 134.56 (d, *J* = 16.9 Hz), 126.89, 120.58 (qd, *J* = 275.0, 4.9 Hz), 115.11, 92.04, 62.05, 60.57 (2C), 44.47, 39.42, 29.38, 28.47 ppm; C₁₇H₁₆F₄N₄O (MW 368.33), LCMS (EI) *m/e* 369 (M⁺ + H).

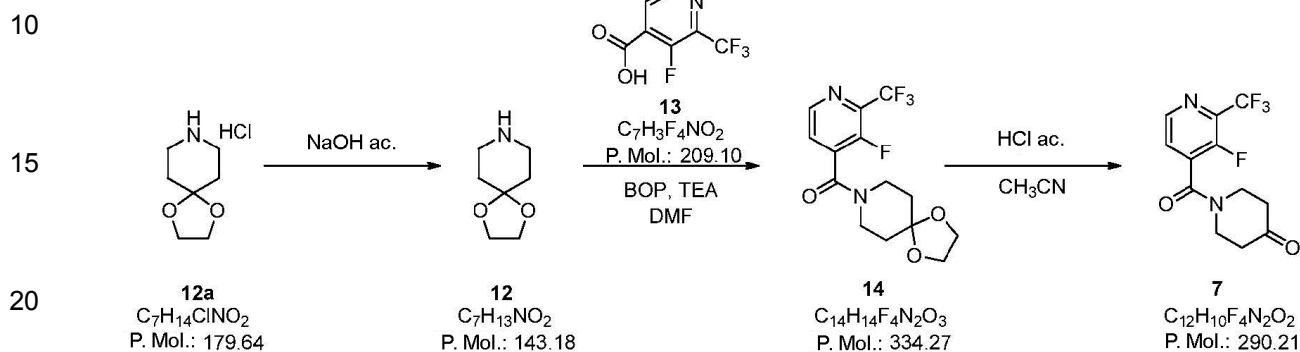
2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetónitrilo (11). A un matraz de 25 ml equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, y un agitador magnético se le añadieron 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (**1**, 210 mg, 1,08 mmol, 1,08 equiv.), 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-ilideno)acetónitrilo (**10**, 370 mg, 1,0 mmol) y acetónitrilo (3 ml) a temperatura ambiente. La solución se trató luego con 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-eno (DBU, 173 mg, 0,17 ml, 1,12 mmol, 1,12 equiv.) a temperatura ambiente y la mezcla de la reacción resultante se calentó a 50° C y se agita a 50° C durante la noche. Cuando la reacción se hubo completado como se monitorizó por HPLC, la mezcla de la reacción se cargó directamente en una columna de gel de sílice (SiO₂) para purificación cromatográfica (MeOH al 0-2,5% en elución de acetato de etilo en gradiente) para proporcionar 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetónitrilo (**11**, 263 mg, 562,4 mg teóricos, 46,7%) como un sólido blanco. Para **11**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 4.10 - 3.99 (m, 1H), 3.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.52 - 3.42 (m, 2H), 3.44 (s, 2H), 3.41 - 3.33 (m, 1H), 3.28 - 3.15 (m, 1H), 3.03 (ddd, *J* = 12.9, 9.2, 3.2 Hz, 1H), 2.51 - 2.44 (m, 1H), 1.77 - 1.66 (m, 1H), 1.64 - 1.54 (m, 1H), 1.28 - 1.17 (m, 2H), 1.24 (s, 12H) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.22, 152.13 (d, *J* = 265.8 Hz), 146.23 (d, *J* = 5.7 Hz), 145.12, 135.41, 134.66 (d, *J* = 16.9 Hz), 134.43 (qd, *J* = 35.0, 11.7 Hz), 127.58, 120.61 (qd, *J* = 274.4, 4.6 Hz), 117.35, 106.59 (br), 83.10, 61.40, 60.53 (2C), 56.49, 44.17, 38.99, 28.55, 27.82, 27.02, 24.63 ppm; C₂₆H₃₁BF₄N₆O₃ (MW 562.37), LCMS (EI) *m/e* 563 (M⁺ + H).

2-(3-(4-(7H-pirrolol[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetónitrilo (8). A un matraz de 25 ml equipado con una entrada de nitrógeno, un termopar, un embudo adicional y un agitador magnético, se añadieron 2-(1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetónitrilo (**11**, 307 mg, 0,546 mmol), 4-cloro-7H-pirrolol[2,3-*d*]pirimidina (**4**, 84,8 mg, 0,548 mmol, 1,0 equiv), bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 229 mg, 2,72 mmol, 5,0 equiv., agua (1,6 ml) y 1,4-dioxano (1,6 ml) a temperatura ambiente. Luego la mezcla se trató con tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (12,8 mg, 0,011 mmol, 0,02 equiv.) a temperatura ambiente y la mezcla de la reacción resultante se desgasificó y se rellenó con nitrógeno 3 veces antes de calentarla a 85° C. La mezcla de la reacción se agitó a 85° C bajo nitrógeno durante la noche. Cuando se hubo completado la reacción según se monitorizó por HPLC, la mezcla de la reacción se concentró hasta la sequedad a presión reducida y se obtuvo el producto deseado, 2-(3-(4-(7H-pirrolol[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-1-(1-(3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil)piperidin-4-il)azetidín-3-il)acetónitrilo (**8** base libre, 135 mg, 302,2 mg teóricos, 44,6%) como sólidos blanquecinos mediante cromatografía en columna directa de gel de sílice (SiO₂) (acetato de

etilo al 0-10% en elución en gradiente de hexanos) purificación de la mezcla de la reacción seca. El compuesto obtenido por este enfoque sintético es idéntico en cada aspecto comparable al compuesto 8 fabricado por el método sintético descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

5 Ejemplo 3. Síntesis de (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona

Esquema III



(3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (14). A un reactor de 30 l equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición y un tabique se cargó hidróxido de sodio (NaOH, 1,4 kg, 35 mol, 2,0 equiv.) y agua (7 l) y la solución resultante se trató con clorhidrato de 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decano (3,13 kg, 17,43 mol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de saturarla con cloruro de sodio sólido (1,3 kg) y se extrajo con 2-metil-tetrahidrofurano (3 x 7 l). La fase orgánica combinada se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄, 1,3 kg) y se concentró a presión reducida (70 mmHg) a 50° C después de la eliminación del reactivo de secado, sulfato de sodio (Na₂SO₄), por filtración. El aceite amarillo así obtenido se destiló a presión reducida (80 mmHg, bp 115 a 120° C) para proporcionar 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decano (2,34 kg, 2,496 kg teóricos, 93,8%) como un aceite claro, que se usó directamente en la reacción de acoplamiento posterior.

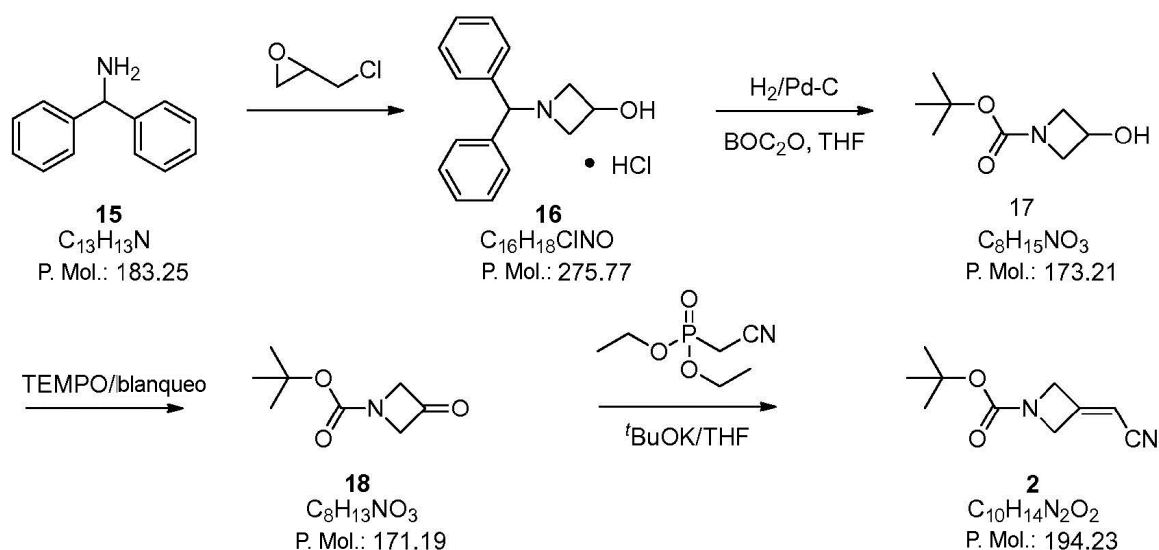
A un reactor de 100 l seco equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición, un termómetro y una salida de vacío se cargó ácido 3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotínico (**13**, 3,0 kg, 14,35 mol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxtris(dimetilamino)fosfonio (reactivo BOP, 7,6 kg, 17,2 mol, 1,2 equiv.), 1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decano (2,34 kg, 16,36 mol, 1,14 equiv.) y *N,N*-dimetilformamida (DMF, 18 l) a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó luego a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de enfriarse a 5 a 10° C. Luego se añadió trietilamina (Et₃N, 4 l, 28,67 mol, 2,0 equiv.) a la mezcla de la reacción durante 1 hora y la temperatura interna se mantuvo entre 5° C y 10° C durante la adición de trietilamina. La solución marrón oscura así obtenida se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20° C) y luego se enfrió a aproximadamente 10° C. Con agitación vigorosa, se añadieron secuencialmente 18 l de solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) saturada y 36 l de agua a la mezcla de la reacción enfriada y la temperatura interna se mantuvo por debajo de 15° C. La precipitación (torta de filtración) así obtenida se recogió por filtración. La fase acuosa se saturó luego con 12 kg de cloruro de sodio (NaCl) sólido y se extrajo con EtOAc (2 x 18 l). La capa orgánica combinada se lavó con solución acuosa de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) saturada (18 l), y agua (2 x 18 l) en secuencia. La torta del filtro recogida se disolvió de nuevo en la fase orgánica y la solución marrón oscuro resultante se lavó con agua (2 x 18 l) antes de concentrarse a presión reducida (40-50° C, 30 mm Hg) para proporcionar aproximadamente 5,0 kg del producto bruto deseado (**14**) como un aceite marrón viscoso. El producto bruto obtenido anteriormente se disolvió luego en EtOH (8,15 l) a 50° C y la solución resultante se trató con agua (16,3 l) durante 30 minutos a aproximadamente 50° C. La solución marrón se sembró antes de enfriarse gradualmente a temperatura ambiente (aproximadamente 20° C) durante 3 horas con agitación y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con una mezcla de EtOH y agua (EtOH:H₂O = 1: 20, 2 l) y se secaron a presión reducida (50 mmHg) a aproximadamente 60° C durante 24 h para proporcionar (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa)-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**14**, 3,98 kg, 4,797 kg teóricos, 83,0%) como un sólido blanco. Para **14**: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (d, ³J_{HH} = 4.68 Hz, 1H, NCH en piridina), 7.92 (dd, ³J_{HH} = 4.68 Hz, ⁴J_{HF} = 4.68 Hz, 1H, NCCH en piridina), 3.87 - 3.91 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.70 (br s, 2H, uno de NCH₂ en el anillo de piperidina, uno del otro NCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en posición axial), 3.26 (t, ³J_{HH} = 5.86 Hz, 2H, uno de NCH₂ en el anillo de piperidina, uno del otro NCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en la posición ecuatorial), 1.67 (d, ³J_{HH} = 5.86 Hz, 2H, uno de NCCH₂ en el anillo de piperidina, uno del otro NCCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en la posición ecuatorial), 1.58 (br s, 2H, uno del NCCH₂ en el anillo de piperidina, uno del otro NCCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en posición axial) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.03 (N-C=O), 151.16 (d, ¹J_{CF} = 266.03 Hz, C-F), 146.85 (d, ⁴J_{CF} = 4.32 Hz, NCH en piridina), 135.24 (d, ²J_{CF} = 11.51 Hz, C-C=O), 135.02 (cuarteto, ²J_{CF} = 34.57 Hz, NCCF₃), 128.24 (d, ⁴J_{CF} =

7.48 Hz, NCCH en piridina), 119.43 (d × cuarteto, $^1 J_{CF} = 274.38$ Hz, $^3 J_{CF} = 4.89$ Hz, CF₃), 106.74 (OCO), 64.60 (OCCO), 45.34 (NC en anillo de piperidina), 39.62 (NC en el anillo de piperidina), 34.79 (NCC en el anillo de piperidina), 34.10 (NCC en el anillo de piperidina) ppm; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.69 (d, $^4 J_{FF} = 15.85$ Hz, F₃C), -129.26 (d × cuarteto, $^4 J_{FF} = 15.85$ Hz, $^4 J_{FH} = 3.96$ Hz, FC) ppm; C₁₄H₁₄F₄N₂O₃ (MW, 334.27), LCMS (EI) *m/e* 335.1 (M⁺ + H).

(3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (7). En un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 5 l equipado con un agitador mecánico, un termopar, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno se cargó (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**14**, 100 g, 0,299 mol) en acetonitrilo (ACN, 400 ml) a temperatura ambiente. La solución resultante se enfrió por debajo de 10° C antes de ser tratada con una solución de ácido clorhídrico (HCl) acuosa 6,0 N (450 ml, 2,70 mol, 9,0 equiv.) mientras la temperatura interna se mantenía por debajo de 10° C. Luego, la mezcla de la reacción resultante se calentó gradualmente a temperatura ambiente y se introdujo lentamente una cantidad adicional de solución de ácido clorhídrico (HCl) acuosa 6,0 N (1,050 ml, 6,30 mol, 21,0 equiv.) a la mezcla de la reacción a temperatura ambiente durante 8 horas a través del embudo de adición. Cuando se hubo completado la reacción según se monitorizó mediante HPLC, la mezcla de la reacción se enfrió a 0° C antes de tratarse con hidróxido de sodio acuoso al 30% (NaOH, 860 ml, 8,57 mmol, 28,6 equiv.) mientras la temperatura interna se mantenía por debajo de 10° C. La mezcla de la reacción resultante se calentó posteriormente a temperatura ambiente antes de la adición de bicarbonato de sodio sólido (NaHCO₃, 85,0 g, 1,01 mol, 3,37 equiv) durante 1 hora. La mezcla se extrajo luego con EtOAc (2 x 1,2 l) y la fase orgánica combinada se lavó con una solución de cloruro de sodio acuosa al 16% (2 x 800 ml) y se concentró hasta aproximadamente 1,0 l mediante destilación al vacío. Se añadió *n*-heptano (2,1 l) al residuo, y la mezcla resultante se concentró a 1,0 l mediante destilación al vacío. A la mezcla concentrada se le añadió *n*-heptano (2,1 l). La lechada blanca resultante se concentró luego a 1,0 l mediante destilación al vacío. A la lechada blanca se le añadió luego metil *tert*-butil éter (MTBE, 1.94 l). El turbio blanco se calentó a 40° C para obtener una solución clara. La solución resultante se concentró hasta aproximadamente 1,0 l mediante destilación al vacío. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado blanco se recogió por filtración, se lavó con *n*-heptano (400 ml) y se secó en el filtro bajo nitrógeno con extracción de vacío para proporcionar (3-fluoro-2-(trifluorometil)piridin-4-il)(1,4-dioxa-8-azaspiro[4,5]decan-8-il)metanona (**7**, 78 g, 86,8 g teóricos, 90,2%) como un sólido blanquecino. Para **7**: ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.68 (d, $^3 J_{HH} = 4.69$ Hz, 1H, NCH en piridina), 7.97 (dd, $^3 J_{HH} = 4.69$ Hz, $^4 J_{HF} = 4.69$ Hz, 1H, NCCH en piridina), 3.92 (br s, 2H, uno de NCH₂ en el anillo de piperidina, uno de otro NCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en posición axial), 3.54 (t, $^3 J_{HH} = 6.15$ Hz, 2H, uno de NCH₂ en el anillo de piperidina, uno de otro NCH₂ en el anillo de piperidina, ambos en posición ecuatorial), 2.48 (t, $^3 J_{HH} = 6.44$ Hz, 2H, NCCH₂), 2.34 (t, $^3 J_{HH} = 6.15$ Hz, 2H, NCCH₂) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 207.17 (C=O), 161.66 (N-C=O), 151.26 (d, $^1 J_{CF} = 266.89$ Hz, C-F), 146.90 (d, $^4 J_{CF} = 6.05$ Hz, NCH en piridina), 135.56 (C-C=O), 134.78 - 135.56 (m, NCCF₃), 128.27 (d, $^3 J_{CF} = 7.19$ Hz, NCCH en piridina), 119.52 (d × cuarteto, $^1 J_{CF} = 274.38$ Hz, $^3 J_{CF} = 4.89$ Hz, CF₃), 45.10 (NC en el anillo de piperidina) ppm, un carbono (NCC en el anillo de piperidina) desaparecido debido a superposición con (CD₃)₂SO; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ -64.58 (d, $^4 J_{FF} = 15.85$ Hz, F₃C), -128.90 (d × cuarteto, $^4 J_{FF} = 15.85$ Hz, $^4 J_{FH} = 4.05$ Hz, FC) ppm; C₁₂H₁₀F₄N₂O₂ (MW, 290.21), LCMS (EI) *m/e* 291.1 (M⁺ + H).

Ejemplo 4. Síntesis de 3-(cianometileno)azetidina-1-carboxilato de *tert*-butilo

Ejemplo IV



Clorhidrato de 1-benzhidrilazetidín-3-ol (16). Una solución de difenilmetanamina (2737 g, 15,0 mol, 1,04 equiv.) en metanol (MeOH, 6 l) se trató con 2-(clorometil)oxirano (1330 g, 14,5 mol) de un embudo de adición a temperatura ambiente. Durante la adición inicial se notó una ligera endotermia. La mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días antes de calentarse a reflujo durante 3 días adicionales. Cuando la TLC mostró que la reacción se había estimado completa, la mezcla de la reacción se enfrió primero a temperatura ambiente y luego a 0-5° C en un baño de hielo. Los sólidos se recogieron por filtración y se lavaron con acetona (4 l) para dar la primera cosecha del producto deseado bruto (1516 g). El filtrado se concentró a presión reducida y el semisólido resultante se diluyó con acetona (1 l). Este sólido se recogió luego por filtración para dar la segunda cosecha del producto deseado bruto (221 g). Se descubrió que el producto bruto, clorhidrato de 1-benzhidrilazetidín-3-ol (1737 g, 3998,7 g teóricos, 43,4% de rendimiento), era lo suficientemente puro para ser usado en la reacción posterior sin purificación adicional. ¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 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; C₁₆H₁₈ClNO (MW 275.77; C₁₆H₁₇NO para base libre, MW, 239.31), LCMS (EI) *m/e* 240 (M⁺ + H).

3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (17). Se agitó una suspensión de clorhidrato de 1-benzhidrilazetidín-3-ol (625 g, 2,27 mol) en una solución al 10% de carbonato de sodio acuoso (Na₂CO₃, 5 l) y diclorometano (CH₂Cl₂, 5 l) a temperatura ambiente hasta que se hubieron disueltos todos los sólidos. Las dos capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (CH₂Cl₂, 2 l). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. La base libre de 1-benzhidrilazetidín-3-ol bruta resultante se disolvió luego en THF (6 l) y la solución se colocó en una bomba Parr grande. Se añadieron dicarbonato de di-*terc*-butilo (BOC₂O, 545 g, 2,5 mol, 1,1 equiv.) y paladio (Pd) al 20% sobre carbono (125 g, 50% de humedad) a la bomba Parr. El recipiente se cargó a 30 psi con gas hidrógeno (H₂) y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno estable (el recipiente se recargó tres veces para mantener la presión a 30 psi) a temperatura ambiente durante 18 h. Cuando la HPLC mostró que la reacción se había completado (no se absorbía más hidrógeno), la mezcla de la reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y la almohadilla de Celite se lavó con THF (4 l). Los filtrados se concentraron a presión reducida para eliminar el solvente y el residuo se cargó en una columna Biotage 150 con una cantidad mínima de diclorometano (CH₂Cl₂). La columna se eluyó con acetato de etilo al 20-50% en *n*-heptano y las fracciones que contenían el producto deseado puro, 3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo, se recogieron y combinaron. Los solventes se eliminaron a presión reducida para proporcionar 3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (357 g, 393,2 g teóricos, 90,8% de rendimiento) como un aceite incoloro, que se solidificó al dejarlo a temperatura ambiente al vacío. ¹HNMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.56 (m 1H), 4.13 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 1.43 (s, 9H) ppm.

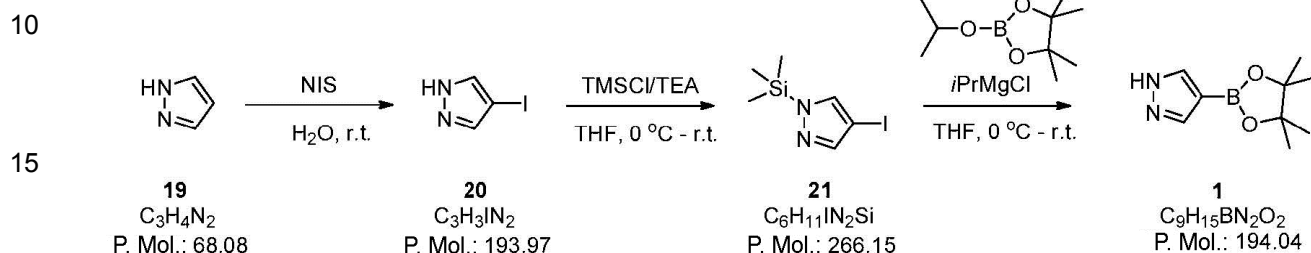
3-oxoacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (18). Una solución de 3-hidroxiacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (50 g, 289 mmol) en acetato de etilo (400 ml) se enfrió a 0° C. La solución resultante se trató luego con TEMPO sólido (0,5 g, 3,2 mmol, 0,011 equiv.) y una solución de bromuro de potasio (KBr, 3,9 g, 33,2 mmol, 0,115 equiv.) en agua (60 ml) a 0-5° C. Mientras se mantenía la temperatura de la reacción entre 0-5° C, se añadieron una solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (NaHCO₃, 450 ml) y una solución de hipoclorito de sodio acuosa (NaClO, 10-13% de cloro disponible, 450 ml). Una vez que se añadió la solución de hipoclorito de sodio, el color de la mezcla de la reacción se cambió de inmediato. Cuando se añadió una cantidad adicional de solución de hipoclorito de sodio, el color de la mezcla de la reacción se desvaneció gradualmente. Cuando la TLC mostró que se había consumido todo el material de partida, ya no se cambió el color de la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción se diluyó luego con acetato de etilo (EtOAc, 500 ml) y se separaron dos capas. La capa orgánica se lavó con agua (500 ml) y la solución de cloruro de sodio acuoso saturado (500 ml) y se secó sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄). El solvente se eliminó luego a presión reducida para dar el producto bruto, 3-oxoacetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (48 g, 49,47 g teóricos, 97% de rendimiento), que se descubrió que era lo suficientemente puro y se usó directamente en la reacción posterior sin purificación adicional. ¹HNMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 4.65 (s, 4H), 1.42 (s, 9H) ppm.

3-(cianometileno)acetidina-1-carboxilato de *terc*-butilo (2). Se añadió dietil cianometil fosfato (745 g, 4,20 mol, 1,20 equiv.) y tetrahidrofurano anhidro (THF, 9 l) a un matraz de cuatro bocas equipado con un termopozo, un embudo de adición y el tubo de protección de nitrógeno a temperatura ambiente. La solución se enfrió con un baño de hielo y metanol a -14° C y se añadió una solución 1,0 M de *terc*-butóxido de potasio (*t*-BuOK) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 3,85 l, 3,85 mol, 1,1 equiv.) durante 20 min manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de -5° C. La mezcla de la reacción resultante se agitó durante 3 horas a -10° C y se añadió una solución de 1-*terc*-butilcarbonil-3-azetidínona (600 g, 3,50 mol) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 2 l) durante 2 h manteniendo la temperatura interna por debajo de -5° C. La mezcla de la reacción se agitó a una temperatura de -5 a -10° C durante 1 h y luego se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de la reacción se diluyó luego con agua (4,5 l) y una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (NaCl, 4,5 l) y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc, 2 x 9 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (6 l) y se secaron sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se diluyó con diclorometano (CH₂Cl₂, 4 l) antes de ser absorbido sobre gel de sílice (SiO₂, 1,5 Kg). El producto bruto, que se había absorbido en gel de sílice, se purificó por cromatografía flash en columna (SiO₂, 3,5 Kg, 0-25% de elución en gradiente de EtOAc/hexanos) para proporcionar 3-(cianometileno)acetidina-1-carboxilato de

tert-butilo (**2**, 414,7 g, 679,8 g teóricos, 61% de rendimiento) como un sólido blanco. Para **2**: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) 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 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

5 Ejemplo 5. Síntesis de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol

Ejemplo V



4-yodopirazol (20). Un matraz equipado con una entrada de nitrógeno, un embudo de adición, un termopozo, y un agitador mecánico se cargó con pirazol (1, 450 g, 6,62 mol) y tetrahidrofurano (THF, 5 l) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió luego a 10°C y se añadió *N*-yodosuccinimida (NIS, 1490 g, 6,62 mol, 1,0 equiv.) a la mezcla en porciones como un sólido a aproximadamente 10°C . La mezcla de la reacción resultante se agitó luego a temperatura ambiente durante 1 hora (pueden ser necesarios tiempos de reacción más largos dependiendo de la temperatura ambiente). La mezcla se filtró luego y el THF se eliminó a presión reducida. El residuo se suspendió en acetato de etilo (6 l) y los materiales insolubles se filtraron. El filtrado oscuro se lavó secuencialmente con una solución de tiosulfato de sodio acuosa saturada (2 x 3 l) (la capa orgánica se aclara a amarillo pálido), agua (2 x 3 l) y salmuera (2 l). La capa orgánica resultante se secó luego sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 4-yodopirazol (1138 g, 1284,1 g teóricos, 88) como un sólido blanco a amarillo claro después de secarse en un horno de vacío a aproximadamente 30°C durante la noche. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.17 (bs, 1H), 7.93 (bs, 1H), 7.55 (bs, 1H) ppm; $\text{C}_3\text{H}_3\text{IN}_2$ (MW, 193.97), LCMS (EI) *m/e* 195 ($\text{M}^+ + \text{H}$).

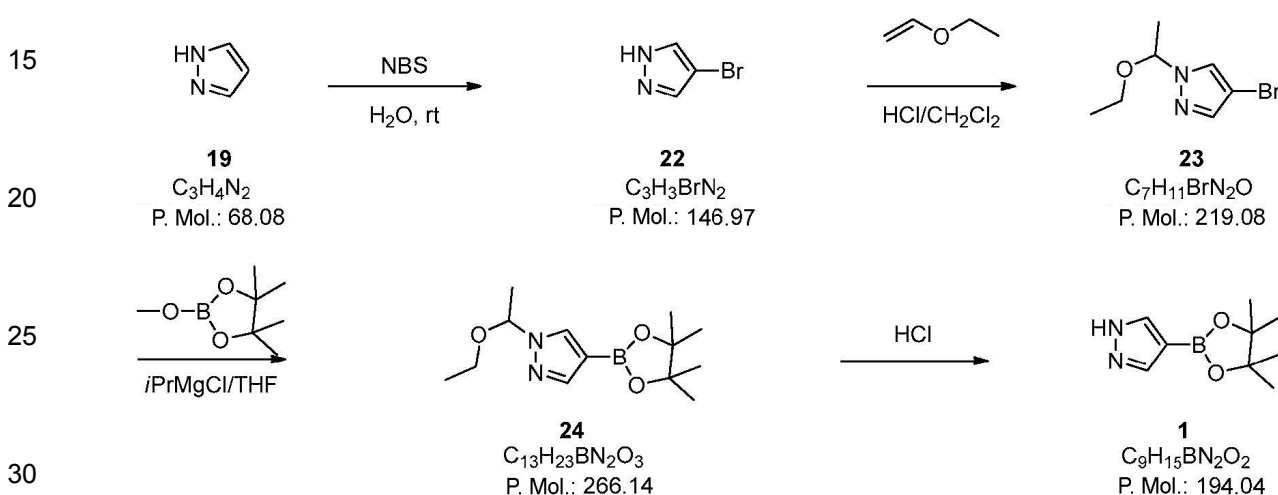
1-trimetilsilil-4-yodopirazol (21). A un matraz equipado con un condensador de reflujo, una entrada de nitrógeno, un agitador mecánico y un termopozo, se cargó 4-yodopirazol (200 g, 1,03 mol) y THF (2 l) a temperatura ambiente. A esta solución se le añadió trietilamina (TEA, 158 ml, 1,13 mol, 1,1 equiv.) y la solución resultante se enfrió a 0°C en un baño de hielo-salmuera. A esta solución se le añadió clorotrimetilsilano (TMS-Cl, 137 ml, 1,08 mol, 1,05 equiv.) con agitación vigorosa permitiendo que la temperatura alcanzase los 18°C . (La reacción se vuelve muy espesa y difícil de agitar, pero se vuelve manejable después de un tiempo). Cuando el proceso exotérmico había disminuido, se retiró el baño frío y la reacción se calentó a temperatura ambiente. La reacción fue seguida por GC y se descubrió que se consideraba completa después de aproximadamente 1 hora (el muestreo de la reacción debe hacerse fuera del aire y diluirse con un solvente seco para evitar la hidrólisis de TMS). La mezcla de la reacción se diluyó entonces con *n*-heptano (2 l) antes de ser filtrado bajo nitrógeno. El solvente se eliminó del filtrado a presión reducida, ventilando el rotavapor con nitrógeno. El aceite residual se diluyó con *n*-heptano (1 l) y se volvió a concentrar. Si se formaban sólidos al añadir el *n*-heptano, era necesaria una segunda filtración. El residuo se destiló luego a presión reducida ($70\text{-}90^\circ\text{C}$ a aproximadamente 0,5 Torr) usando un Kugelohr para proporcionar 1-trimetilsilil-4-yodopirazol (263 g, 274,1 g teóricos, 96%) como un aceite incoloro. Este material debe mantenerse bajo nitrógeno en todo momento, ya que el grupo TMS hidroliza rápidamente. Posteriormente, se descubrió que el 1-trimetilsilil-4-yodopirazol puede prepararse calentando el yodopirazol con 2 equivalentes de hexametildisilazano durante 1 hora.

4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1). Un matraz equipado con un agitador mecánico, una entrada de nitrógeno, un embudo de adición y un termopozo se cargó con 1-trimetilsilil-4-yodopirazol (225,1 g, 0,85 mol) y THF (2200 ml) a temperatura ambiente. Esta mezcla se enfrió a aproximadamente -6°C en un baño de hielo/sal/salmuera antes de añadir una solución de cloruro de isopropilmagnesio en THF (solución 2 M en THF, 510 ml, 1,02 mol, 1,2 equiv.) a una velocidad tal que La temperatura interna no excediese de 0°C . La extensión del intercambio de metal/halógeno se monitorizó por GC y se encontró completa después de aproximadamente 10 min. A la solución de color marrón anaranjado se le añadió luego 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (isopropilpinacolborato, 347 ml, 1,7 mol, 2.0 equiv.) lentamente al principio manteniendo la temperatura por debajo de 0°C y luego bastante rápidamente después de que se añadiese aproximadamente la mitad del compuesto permitiendo que la temperatura alcanzase los 5°C (la reacción se vuelve bastante espesa y luego se diluye lentamente). La reacción se agita luego a 0°C durante 10 minutos antes de calentarse a temperatura ambiente durante 1 hora y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora adicional. La mezcla de la reacción se enfrió a aproximadamente 6°C y se añadió la solución de cloruro de amonio acuosa

saturada (NH₄Cl, 2,2 l) con un aumento de temperatura a 25° C. La mezcla se agitó durante 5 minutos antes de diluirse con tolueno (10 l). Las capas se separaron (una gran cantidad de sólido está presente en la capa acuosa) y la capa orgánica se lavó secuencialmente con agua (6 x 2,2 l) y salmuera (2 x 2,2 l) antes de secarla sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄). El reactivo de secado, sulfato de sodio (Na₂SO₄), se eliminó por filtración y la solución se concentró a presión reducida. El tolueno residual se co-evaporó con *n*-heptano para proporcionar 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**1**, 90,3 g, 164,9 g teóricos, 54,8%) como un sólido blanco. Para **1**: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.08 (bs, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 1.23 (s, 12H) ppm; C₉H₁₅BN₂O₂ (MW, 194.04), LCMS (EI) *m/e* 195 (M⁺ + H).

10 Ejemplo 6. Síntesis alternativa de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol

Esquema VI



4-bromopirazol (22). Se suspendieron pirazol (**19**, 34,0 g, 0,5 mol) y NBS (89,0 g, 0,5 mol, 1,0 equiv.) en agua (625 ml) a temperatura ambiente. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de la reacción se extrajo luego con EtOAc (2 x 100 ml). Los extractos de EtOAc combinados se lavaron con Na₂S₂O₃ acuoso y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, y se concentraron a presión reducida para proporcionar el 4-bromopirazol bruto (72,0 g, 73,5 g teóricos, 98% de rendimiento) como sólidos blancos (pureza GC:> 98%), que se usó directamente en la reacción posterior sin purificación adicional.

4-bromo-1-(etoxietil)-1*H*-pirazol (23). A una solución de 4-bromopirazol (70,0 g, 0,476 mol) en CH₂Cl₂ (600 ml) se añadió una solución de HCl 3,1 M en dioxano (4 ml) y etil vinil éter (41 g, 0,569 mol, 1,2 equiv) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se inactivó con NaHCO₃ acuoso y se separaron las dos capas. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró a presión reducida hasta la sequedad para proporcionar 4-bromo-1-(etoxietil)-1*H*-pirazol (113 g, 104,3 g teóricos, 97% de rendimiento) como un aceite (pureza GC: 89%), que se usó directamente en la reacción posterior sin purificación adicional.

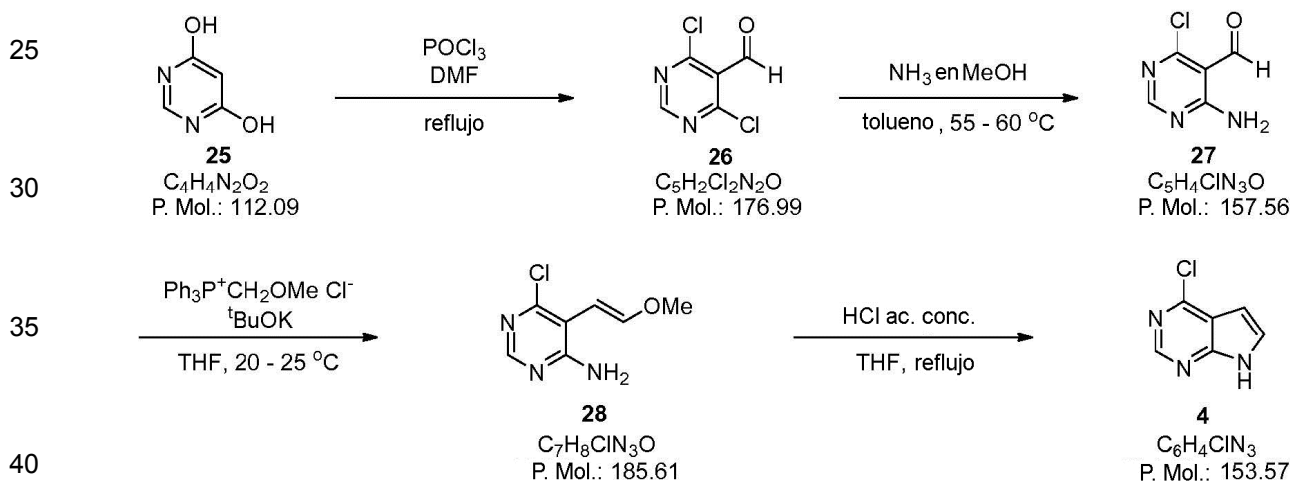
1-(etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (24). A una solución de 100 ml de *i*PrMgCl.LiCl (50 mmol, 1,8 equiv) en THF se le añadió 4-bromo-1-(etoxietil)-1*H*-pirazol (6,15 g, 28 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h y luego se enfrió a -20° C. Luego se añadió pinacolborato de metoxi (10,6 g, 67 mmol, 2,4 equiv.) a la mezcla de la reacción a -20° C. La mezcla resultante se agitó a 0-10° C durante 1 h. Se añadió NH₄Cl acuoso para inactivar la reacción. La mezcla se extrajo luego con éter de petróleo (PE). Los extractos de PE combinados se lavaron con NaHCO₃ saturado, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentra bajo presión reducida. El producto bruto se cristalizó en PE para proporcionar 1-(etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**24**, 4,2 g, 7,45 g teóricos, 56,4% de rendimiento) como un sólido de blanco a blanquecino (pureza GC: 99%). Para **24**: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 8.09 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 5.55 (q, 1H, *J* = 6.1 Hz), 3.37 (dq, 1H, *J* = 7.1, 9.6 Hz), 3.12 (dq, 1H, *J* = 7.0, 9.7 Hz), 1.56 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 1.24 (s, 12H), 1.00 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz) ppm; C₁₃H₂₃BN₂O₃ (MW, 266.14), LCMS (EI) *m/e* 267 (M⁺ + H).

4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (1). A una mezcla de 2,3-dimetilbutano-2,3-diol (25,0 kg, 211,6 mol) y 1-(1-(etoxietil)-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (**24**, 55,0 kg, 206,7 moles) en 1,2-dicloroetano (750 kg) se le añadió lentamente una solución de HCl en MTBE (25,0 kg, 20-30% de HCl) a 0-5° C. La mezcla de la reacción resultante se agitó luego a 10-20°C durante 3-5 horas. Después de que se hubo completado la reacción de desprotección selectiva según se monitorizó por HPLC (**1**:por debajo del 1%), la mezcla

de la reacción se desgasificó y se rellenó con nitrógeno antes de enfriarla a -15°C . Luego, a la mezcla de la reacción enfriada se añadió trietilamina (TEA, 30,0 kg, 296,5 mol) para ajustar el pH a 7-8. La mezcla se calentó luego gradualmente a temperatura ambiente antes de ser tratada con agua (150 kg). Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (60 kg) y se secó sobre sulfato de sodio (Na_2SO_4). El reactivo de secado, sulfato de sodio (Na_2SO_4), se eliminó por filtración y la solución resultante se concentró a presión reducida a $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$ hasta obtener un aceite espeso. El residuo se calentó a $60\text{-}70^{\circ}\text{C}$ y se diluyó con éter de petróleo (100 kg) a la misma temperatura. La mezcla resultante se enfrió luego gradualmente a temperatura ambiente y posteriormente a -5°C y se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. Los sólidos se recogieron por centrifugación y se secaron a $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$ al vacío para proporcionar el producto bruto deseado (**1**, 33,75 kg, 40,11 kg teóricos, 84,1%). El producto bruto deseado se suspendió luego en 1,2-dicloroetano (30 kg) y la mezcla resultante se calentó a reflujo hasta que se formó una solución transparente. A la solución caliente se le añadió luego éter de petróleo (150 kg) a la misma temperatura. La mezcla resultante se enfrió luego gradualmente a temperatura ambiente y posteriormente a -5°C y se agitó a la misma temperatura durante 3 horas. Los sólidos se recogieron por centrifugación y se secaron al vacío a $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$ para proporcionar 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (**1**, 31,0 kg, 40,11 kg teóricos, 77,3%) como un sólido blanquecino, que es idéntico en todos los aspectos comparables al material sintetizado por el método sintético descrito anteriormente en el Ejemplo 5.

Ejemplo 7. Síntesis de 4-cloro-7H-[pirrolo[2,3-d]pirimidina

Esquema VII



4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído (26). En un matraz de 5 l de 4 bocas equipado con un agitador mecánico, un embudo de adición, un condensador, un termopar y un barrido de N_2 en una solución de depuración de NaOH acuosa, se cargó oxiclورو de fósforo (POCl_3 , 1 l, 10,572 mol, 4,82 equivalentes) y se enfrió en un baño de hielo/sal. Luego se añadió gota a gota *N,N*-dimetilformamida (DMF, 320 ml, 4,138 mol, 1,85 equiv.) al matraz a $0 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de la adición de aproximadamente 100 ml de DMF durante aproximadamente 0,5 h, tuvo lugar la cristalización y la temperatura de la reacción se incrementó de 0 a 10°C . Se detuvo la adición y se permitió que la mezcla enfriase a aproximadamente 2°C . El DMF restante se añadió durante 2,5 h a menos de 8°C . La suspensión se volvió muy espesa haciendo difícil la agitación. Cuando se completó la adición de DMF, la mezcla se agitó a $3\text{-}5^{\circ}\text{C}$ durante 0,5 h. Se añadió 4,6-dihidroxipirimidina (250 g, 2,232 mol) en porciones como un sólido. Después de añadir aproximadamente un tercio de 4,6-dihidroxipirimidina, la mezcla de la reacción se volvió más móvil y tuvo lugar un fenómeno exotérmico lento con la temperatura de la reacción aumentando a aproximadamente 12°C durante 0,5 h. La 4,6-dihidroxipirimidina restante se añadió en porciones durante 0,25 h con temperatura de la reacción aumentando de 12 a 27°C . La temperatura de la reacción se mantuvo a $25\text{-}27^{\circ}\text{C}$ con enfriamiento intermitente, tiempo durante el cual la suspensión amarilla se volvió más fina y luego más espesa de nuevo. Después de que el fenómeno exotérmico disminuyó en aproximadamente 1 h, la mezcla de la reacción se calentó lentamente. A aproximadamente 55°C , la mezcla de la reacción se volvió extremadamente espesa y se produjo el segundo fenómeno exotérmico leve. La manta de calentamiento se retiró mientras la temperatura de reacción continuaba aumentando a aproximadamente 63°C y se mantuvo a esta temperatura durante varios minutos antes de caer. El calentamiento de la mezcla se reanudó hasta alcanzar un reflujo suave (aproximadamente 100°C). A aproximadamente 95°C , comenzó una evolución constante bastante rápida del gas HCl y la mezcla de la reacción se diluyó y se oscureció gradualmente. Después de aproximadamente 0,5 h, se desarrolló una solución marrón clara con la temperatura de reflujo aumentando lentamente a 115°C durante 1,25 h. Después de un total de 2,5 horas a reflujo, la mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El exceso de cantidad de POCl_3 (en la medida de lo posible) se eliminó a presión reducida (temperatura

del baño 45-50° C). El aceite marrón residual espeso se vertió muy lentamente en H₂O frío (5 l) en un embudo de separación 20 L, se añadió hielo según fue necesario para mantener la mezcla acuosa a temperatura ambiente. La mezcla acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 3 l seguido de 1 x 2 l). Los extractos de EtOAc combinados se lavaron con H₂O (2 x 2,5 L), solución acuosa de NaHCO₃ saturada (1 l), salmuera (1 l), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida (temperatura del baño a 35° C) para proporcionar el 4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído bruto (270 g, 395 g teóricos, 68,4%) como sólidos amarillo-anaranjados. Una porción de 20 g de este material bruto se purificó por destilación de Kugelrohr (temperatura del horno a 90-100° C, 225 mTorr) para dar 15,3 g de 4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído puro como un sólido blanco que se volvió amarillo en reposo a temperatura ambiente. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.46 (s, 1H), 8.89 (s, 1H) ppm.

4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído (27). Una solución de NH₃ 7 M se añadió en MeOH (265 ml, 1,855 mol, 2,0 equiv) durante 1,25 h a una solución de 4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído (163,7 g, 0,9301 mol) en tolueno (3 l) a temperatura ambiente. La temperatura de la reacción aumentó lentamente de 20 a 26° C y se formó una suspensión amarilla. Se aplicó un enfriamiento suave para mantener la temperatura de la reacción por debajo de 26° C. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h antes de que los sólidos se recogieran por filtración. Los sólidos se lavaron con EtOAc (1 l). El filtrado se concentró a presión reducida y los sólidos se trituraron con tolueno y *n*-heptano (2:1 v/v, 600 ml), se filtraron y se secaron para dar 71,1 g de 4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído como un sólido amarillo. El sólido original filtrado de la mezcla de la reacción contenía una cantidad adicional de 4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído. El producto se extrajo del sólido filtrado mediante agitación en EtOAc (1,25 l) durante 1,5 h, filtrando, luego agitando en THF (750 ml) durante 1 h y filtrando de nuevo. Los filtrados tanto de EtOAc como de THF se concentraron a presión reducida y los sólidos resultantes se trituraron con tolueno y *n*-heptano (2:1 v/v, 450 ml), se filtraron y se secaron para dar 44,1 g adicionales de 4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído como un sólido amarillo. El rendimiento combinado de 4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído (115,2 g, 146,5 g teóricos) fue de 78.6%. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.23 (s, 1H), 8.71 (bs, 1H), 8.55 (bs, 1H), 8.39 (s, 1H) ppm; C₅H₄ClN₃O (MW, 157.56), LCMS (EI) *m/e* 158 (M⁺ + H).

6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamina (28). Una suspensión de cloruro de (metoximetil)trifenilfosfonio (276.0 g, 0,807 mol, 1,1 equiv.) en THF (1.5 L) se enfrió en un baño de hielo/sal a -2° C y se añadió terc-butóxido de potasio 1 M (KO^tBu) en THF (807 ml, 0,807 mol, 1,1 equiv.) durante 1,5 h a de -2 a -3° C. La mezcla roja anaranjada intensa se agitó a de -2 a -3° C durante 1 h. Luego se añadió en porciones 4-amino-6-cloropirimidina-5-carbaldehído (115,2 g, 0,7338 mol, 1,0 equiv) a la mezcla de la reacción como una forma sólida usando THF (200 ml) para enjuagar el recipiente y el embudo. Durante la adición, la temperatura de la reacción aumentó de -3 a 13° C y se desarrolló un color marrón. Cuando la temperatura de reacción cayó a 10° C, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 42 h. La mezcla de la reacción se enfrió a -2° C antes de inactivarse mediante la adición lenta de solución acuosa de NH₄Cl saturada (750 ml). La mezcla se concentró a presión reducida para eliminar la mayor parte del THF. El residuo se repartió entre EtOAc (3 l) y H₂O (1 l). La fase orgánica se filtró para eliminar el material insoluble en la interfaz, luego se extrajo con HCl 2 N (4 x 250 ml) seguido de HCl 3 N (2 x 250 ml). Los extractos de HCl combinados se volvieron a extraer con EtOAc (500 ml) y luego se filtraron a través de Celite para eliminar el material insoluble. El filtrado se enfrió en un baño de hielo/salmuera, se ajustó a pH 8 con una solución de NaOH 6 N acuosa y se extrajo con EtOAc (3 x 1 l). Los extractos de EtOAc combinados se lavaron con salmuera (1 l), se secaron sobre Na₂SO₄, se agitaron con carbón vegetal (10 g) y gel de sílice (10 g) durante 1 h. La mezcla se filtró a través de Celite, lavando la almohadilla de Celite con EtOAc (1 l). El filtrado se concentró, co-evaporando el EtOAc residual con *n*-heptano (500 ml). El sólido de color tostado resultante se bombeó a vacío alto durante 2 h para proporcionar 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamina bruta (72,3 g, 136,2 g teóricos, 53,1%). El producto deseado bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. Se purificó una muestra de producto bruto (2,3 g) mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con 0-35% de EtOAc/*n*-heptano para dar 1,7 g de 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamina pura como un sólido blanco, que se descubrió era una mezcla de 1 a 2 de *E/Z* isómeros. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) para *E*-isómero: δ 8.02 (s, 1H), 7.08 (bs, 2H), 6.92 (d, 1H, *J* = 13.1), 5.35 (d, 1H, *J* = 13.0 Hz), 3.68 (s, 3H) ppm y para *Z*-isómero: δ 8.06 (s, 1H), 7.08 (bs, 2H), 6.37 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 5.02 (d, 1H, *J* = 6.7 Hz), 3.69 (s, 3H) ppm; C₇H₈ClN₃O (MW, 185.61), LCMS (EI) *m/e* 186/188 (M⁺ + H).

4-cloro-7H-[pirrolo[2,3-*d*]pirimidina (4). Se añadió HCl concentrado (5 ml) a una solución de 6-cloro-5-(2-metoxivinil)pirimidin-4-ilamina bruta (70,0 g, 0,3784 mol) en THF (700 ml) y la mezcla de la reacción resultante se calentó a reflujo durante 7,5 h. Al calentarse se formó una suspensión ligera que se disolvió gradualmente. Cuando se consideró que la reacción se había completado como se monitorizó por HPLC, la mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió NaHCO₃ sólido (15 g) a la mezcla de la reacción y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadieron carbón vegetal (7 g), gel de sílice (7 g) y Na₂SO₄ (20 g) y la mezcla se calentó a 40°C durante 1 h. La mezcla se enfrió luego a temperatura ambiente y se filtró a través de Celite, lavando la almohadilla de Celite con THF (1 l). El filtrado se concentró a presión reducida y el sólido resultante se secó a presión reducida para proporcionar 4-cloro-7H-[pirrolo[2,3-*d*]pirimidina bruta (4, 58,1 g, 58,1 g teóricos, 100%) como un sólido amarillo-marrón. Este producto bruto deseado se disolvió en EtOAc (1 l) a 50-55° C y se trató con carbón activado (3 g). La mezcla se filtró mientras se calentaba a través de Celite y la almohadilla de Celite se lavó con EtOAc caliente (250 ml). El filtrado se concentró a aproximadamente 500 ml y la suspensión se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. La suspensión

se enfrió posteriormente a 0-5° C durante 2 h antes de recoger los sólidos por filtración. Los sólidos se secaron para proporcionar 4-cloro-7H-[pirrolo[2,3-d]pirimidina pura (4, 54,5 g, 58,1 g teóricos, 94%) como cristales de color amarillo-marrón. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.58 (bs, 1H), 8.58 (s,1H), 7.69 (d,1H, *J* = 3.5 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz) ppm; LCMS (EI) *m/e*154/156 (M⁺ +H).

5

Ejemplo de referencia A: Ensayo de JAK quinasa *in vitro*

El compuesto de Fórmula I se probó para su actividad inhibitoria de los objetivos de JAK de acuerdo con el siguiente ensayo *in vitro* descrito en Park et al., *Analytical Biochemistry* 1999, 269, 94-104. Los dominios catalíticos de JAK1 humana (a.a. 837-1142) y JAK2 (a.a. 828-1132) con un marcador His N-terminal se expresaron usando baculovirus en células de insecto y se purificaron. La actividad catalítica de JAK1 y JAK2 se analizó midiendo la fosforilación de un péptido biotinilado. El péptido fosforilado se detectó por fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF). Se midieron los IC₅₀ de los compuestos para cada quinasa en las reacciones de 40 microl que contienen la enzima, ATP y péptido 500 nM en un tampón Tris 50 mM (pH 7,8) con NaCl 100 mM, DTT 5 mM y 0,1 mg/ml (0,01%) de BSA. Para las mediciones de IC₅₀ de 1mM, la concentración de ATP en las reacciones fue de 1 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se detuvieron con 20 µl de 45 mM EDTA, 300 nM SA-APC, 6 nM Eu-Py20 en tampón de ensayo (Perkin Elmer, Boston, MA). La unión al anticuerpo marcado con europio tuvo lugar durante 40 minutos y se midió la señal de HTRF en un lector de placas Fusion (Perkin Elmer, Boston, MA). El compuesto de Fórmula I y la sal de ácido adípico tenían un IC₅₀ en JAK1 de ≤ 5 nM (medido a ATP 1 mM) con una relación JAK2/JAK1 de > 10 (medido a ATP 1 mM).

10

15

20

Ejemplo de referencia B: Ensayos celulares

Las líneas celulares de cáncer dependientes de citoquinas y, por lo tanto, la transducción de señales JAK/STAT, para el crecimiento, pueden colocarse en placas a 6000 células por pocillo (formato de placa de 96 pocillos) en RPMI 1640, FBS al 10% y 1 nG/ml de citoquina apropiada. Los compuestos pueden añadirse a las células en DMSO/medio (concentración final 0,2% de DMSO) e incubarse durante 72 horas a 37° C, 5% de CO₂. El efecto del compuesto sobre la viabilidad celular se evalúa utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) seguido de la cuantificación por TopCount (Perkin Elmer, Boston, MA). Los efectos fuera del objetivo potenciales de los compuestos se miden en paralelo usando una línea celular no accionada por JAK con la misma lectura de ensayo. Todos los experimentos se realizan típicamente por duplicado.

25

30

Las líneas celulares anteriores también pueden usarse para examinar los efectos de los compuestos sobre la fosforilación de las JAK quinastas o sustratos descendentes potenciales como las proteínas STAT, Akt, Shp2 o Erk. Estos experimentos se pueden realizar después de una inanición de citoquinas durante la noche, seguido de una breve preincubación con compuesto (2 horas o menos) y estimulación de citoquinas de aproximadamente 1 hora o menos. Luego las proteínas se extraen de las células y se analizan mediante técnicas familiares para los expertos en la técnica incluyendo transferencia Western o ELISA usando anticuerpos que pueden diferenciar entre proteínas fosforiladas y totales. Estos experimentos pueden utilizar células normales o cancerosas para investigar la actividad de compuestos sobre la biología de supervivencia de las células tumorales o sobre mediadores de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, con respecto a estos últimos, pueden usar citoquinas tales como IL-6, IL-12, IL-23, o IFN para estimular la activación de JAK que resulta en la fosforilación de la proteína(s) STAT y potencialmente en los perfiles transcripcionales (evaluados por tecnología de matriz o qPCR) o producción y/o secreción de proteínas, como IL-17. La capacidad de los compuestos para inhibir estos efectos mediados por citoquinas puede medirse usando técnicas comunes para los expertos en la técnica.

35

40

45

Los compuestos de la presente también pueden probarse en modelos celulares diseñados para evaluar su potencia y actividad contra JAK mutantes, por ejemplo, la mutación JAK2V617F encontrada en trastornos proliferativos mieloides. Estos experimentos a menudo utilizan células dependientes de citoquinas de linaje hematológico (por ejemplo, BaF/3) en las que se expresan ectópicamente JAK quinastas de tipo salvaje o mutantes (James, C., et al. *Nature* 434:1144-1148; Staerk, J., et al., *JBC* 280:41893-41899). Los puntos finales incluyen los efectos de los compuestos sobre la supervivencia celular, la proliferación y las proteínas JAK, STAT, Akt o Erk fosforiladas.

50

Ciertos compuestos de la presente pueden evaluarse por su actividad que inhibe la proliferación de células T. Tal ensayo puede considerarse un segundo ensayo de proliferación impulsado por citoquinas (es decir, JAK) y también un ensayo simplista de supresión inmune o inhibición de la activación inmune. Lo siguiente es un breve resumen de cómo se pueden realizar tales experimentos. Se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre completa humana usando el método de separación Ficoll Hypaque y las células T (fracción 2000) pueden obtenerse a partir de las PBMC por elutriación. Las células T humanas aisladas recientemente se pueden mantener en medio de cultivo (RPMI 1640 suplementado con un suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin) a una densidad de 2 x 10⁶ células/ml a 37° C hasta 2 días. Para el análisis de la proliferación celular estimulada por IL-2, las células T se tratan primero con fitohemaglutinina (PHA) a una concentración final de 10 µg/ml durante 72 h. Después de lavar una vez con PBS, se colocaron en placas 6000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con compuestos a diferentes concentraciones en el medio

55

60

65

de cultivo en presencia de 100 U/ml de IL-2 humana (ProSpec-Tany TechnoGene; Rehovot, Israel) . Las placas se incuban a 37° C durante 72 h y el índice de proliferación se evalúa usando reactivos luminiscentes CellTiter-Glo siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Promega; Madison, WI).

5 **Ejemplo de referencia C: Eficacia antitumoral *in vivo***

Los compuestos de la presente pueden evaluarse en modelos de xenoinjerto de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Por ejemplo, puede usarse una variante tumorigénica de la línea celular de plasmacitoma INA-6 para inocular ratones SCID por vía subcutánea (Burger, R., et al., Hematol J. 2:42-53, 2001). Los animales portadores de tumores pueden ser luego asignados al azar en grupos de tratamiento con fármacos o vehículos y se les puede administrar diferentes dosis de compuestos por cualquier número de las vías habituales, incluyendo infusión oral, i.p. o continua, usando bombas implantables. El crecimiento del tumor se sigue a lo largo del tiempo usando calibradores. Además, las muestras de tumores pueden recogerse en cualquier momento después del inicio del tratamiento para el análisis como se ha descrito anteriormente (Ejemplo B) para evaluar los efectos de los compuestos en la actividad de JAK y las vías de señalización descendentes. Además, la selectividad del compuesto(s) puede evaluarse utilizando modelos de tumores de xenoinjerto impulsados por otras quinasas conocidas (por ejemplo, Bcr-Abl) como el modelo tumoral K562.

20 **Ejemplo de referencia D: Prueba de respuesta de hipersensibilidad retardada en contacto con la piel murina**

Los compuestos de la presente también pueden probarse para determinar su eficacia (de inhibición de objetivos JAK) en el modelo de prueba de hipersensibilidad retardada murina impulsada por células T. La respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) en contacto con la piel se considera un modelo válido de dermatitis de contacto clínico y otros trastornos inmunitarios de la piel mediados por linfocitos T, como la psoriasis (Immunol Today. Enero 1998;19(1):37-44). La DTH murina comparte múltiples características con la psoriasis, incluyendo el infiltrado inmune, el aumento acompañante de citoquinas inflamatorias y la hiperproliferación de queratinocitos. Además, muchas clases de agentes que son eficaces para tratar la psoriasis en la clínica también son inhibidores eficaces de la respuesta DTH en ratones (Agents Actions. Enero 1993; 38 (1-2): 116-21).

En los días 0 y 1, los ratones Balb/c se sensibilizan con una aplicación tópica, en su abdomen afeitado con el antígeno 2,4,dinitro-fluorobenceno (DNFB). En el día 5, se mide el espesor de las orejas con un micrómetro de ingeniero. Esta medición se registra y se usa como valor de referencia. Ambas orejas de los animales se estimulan mediante una aplicación tópica de DNFB en un total de 20 µl (10 µl en el pabellón interno y 10 µl en el pabellón externo) a una concentración del 0,2%. De veinticuatro a setenta y dos horas después del desafío, los oídos se miden de nuevo. El tratamiento con los compuestos de prueba se administra durante las fases de sensibilización y desafío (día - 1 a día 7) o antes y durante la fase de desafío (habitualmente la tarde del día 4 al día 7). El tratamiento de los compuestos de prueba (en diferentes concentraciones) se administra o sistémicamente o tópicamente (aplicación tópica del tratamiento en los oídos). La eficacia de los compuestos de prueba se indica por una reducción en la hinchazón del oído en comparación con la situación sin el tratamiento. Los compuestos que provocaron una reducción del 20% o más se consideraron eficaces. En algunos experimentos, los ratones se desafiaron pero no se sensibilizaron (control negativo).

El efecto inhibitor (inhibición de la activación de las vías JAK-STAT) de los compuestos de prueba puede confirmarse mediante análisis inmunohistoquímico. La activación de la vía(s) JAK-STAT da como resultado la formación y translocación de factores de transcripción funcionales. Además, la afluencia de células inmunes y la proliferación aumentada de queratinocitos también deben proporcionar cambios en el perfil de expresión únicos en el oído que pueden investigarse y cuantificarse. Las secciones de oído fijadas con formalina e incrustadas en parafina (recogidas después de la fase de desafío en el modelo DTH) se someten a análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo que interactúa específicamente con STAT3 fosforilado (clon 58E12, Cell Signaling Technologies). Las orejas del ratón se tratan con compuestos de prueba, vehículo o dexametasona (un tratamiento clínicamente eficaz para la psoriasis), o sin ningún tratamiento, en el modelo DTH para comparaciones. Los compuestos de prueba y la dexametasona pueden producir cambios transcripcionales similares tanto cualitativamente como cuantitativamente, y tanto los compuestos de prueba como la dexametasona pueden reducir el número de células infiltrantes. Tanto la administración sistémica como la tópica de los compuestos de prueba pueden producir efectos inhibidores, es decir, la reducción en el número de células infiltrantes y la inhibición de los cambios transcripcionales.

55 **Ejemplo de referencia E: Actividad antiinflamatoria *in vivo***

Los compuestos de la presente pueden evaluarse en modelos de roedores o no roedores diseñados para replicar una respuesta de inflamación simple o compleja. Por ejemplo, pueden usarse modelos de roedores de artritis para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos dosificados preventivamente o terapéuticamente. Estos modelos incluyen, pero no están limitados a, artritis inducida por colágeno de ratón o rata, artritis inducida por adyuvante de rata y artritis inducida por anticuerpos de colágeno. Las enfermedades autoinmunes incluyendo, pero no limitadas a, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, uveorretinitis, tiroiditis, miastenia grave, nefropatías por inmunoglobulina, miocarditis, sensibilización de las vías respiratorias (asma), lupus o colitis, también pueden usarse

para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos de la presente. Estos modelos están bien establecidos en la comunidad de investigación y son familiares para aquellos expertos en la técnica (Current Protocols in Immunology, Vol. 3, Coligan, J.E. et al., Wiley Press.; Methods in Molecular Biology: Vol. 225, Inflammation Protocols., Winyard, P.G. y Willoughby, D.A., Humana Press, 2003.).

5

Ejemplo de referencia F: Modelos animales para el tratamiento del ojo seco, uveítis y conjuntivitis

Los agentes pueden evaluarse en uno o más modelos preclínicos de ojo seco conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, el modelo de glándula lacrimal de conejo concanavalina A (ConA), el modelo de ratón con escopolamina (subcutánea o transdérmica), el modelo de glándula lagrimal de ratón Botulinum, o cualquiera de una serie de modelos autoinmunes de roedores espontáneos que dan como resultado disfunción de la glándula ocular (por ejemplo, NOD-SCID, MRL/lpr, o NZB/NZW) (Barabino et al., Experimental Eye Research 2004, 79, 613-621 y Schrader et al., Developmental Ophthalmology, Karger 2008, 41, 298-312, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Los puntos finales en estos modelos pueden incluir histopatología de las glándulas oculares y el ojo (córnea, etc.) y posiblemente la prueba clásica de Schirmer o versiones modificadas de la misma (Barabino et al.) que miden la producción de lágrimas. La actividad puede evaluarse dosificando a través de múltiples vías de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que exista una enfermedad medible.

Los agentes pueden evaluarse en uno o más modelos preclínicos de uveítis conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no están limitados a, modelos de uveítis autoinmune experimental (EAU) y uveítis inducida por endotoxinas (EIU). Los experimentos con EAU pueden realizarse en conejo, rata o ratón y pueden implicar la inmunización pasiva o activa. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de una serie o antígenos retinianos para sensibilizar a los animales a un inmunógeno relevante, después de lo cual los animales pueden ser desafiados ocularmente con el mismo antígeno. El modelo EIU es más preciso e implica la administración local o sistémica de lipopolisacárido en dosis subletales. Los puntos finales para los modelos EIU y EAU pueden incluir examen fundoscópico, histopatología, entre otros. Estos modelos son revisados por Smith et al. (Immunology and Cell Biology 1998, 76, 497-512, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). La actividad se evalúa mediante la dosificación a través de múltiples vías de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que exista una enfermedad medible. Algunos modelos enumerados anteriormente también pueden desarrollar escleritis/episcleritis, corioditis, ciclitis o iritis y son, por lo tanto, útiles para investigar la actividad potencial de los compuestos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades.

Los agentes también pueden evaluarse en uno o más modelos preclínicos de conjuntivitis conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no están limitados a, modelos de roedores que utilizan cobayas, ratas o ratones. Los modelos de cobaya incluyen aquellos que utilizan inmunización activa o pasiva y/o protocolos de desafío inmunológico con antígenos como ovoalbúmina o ambrosía (revisado en Groneberg, D.A., et al., Allergy 2003, 58, 1101-1113), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Los modelos de rata y ratón son similares en diseño general a los de cobaya (también revisado por Groneberg). La actividad puede evaluarse dosificando a través de múltiples vías de administración (por ejemplo, sistémica o tópica) que pueden comenzar antes o después de que exista una enfermedad medible. Los puntos finales para tales estudios pueden incluir, por ejemplo, análisis histológico, inmunológico, bioquímico o molecular de tejidos oculares como la conjuntiva.

Ejemplo de referencia G: Protección *in vivo* del hueso

Los compuestos pueden evaluarse en varios modelos preclínicos de osteopenia, osteoporosis o reabsorción ósea conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse roedores ovariectomizados para evaluar la capacidad de los compuestos para afectar las señales y marcadores de remodelación y/o densidad ósea (W.S.S Jee y W. Yao, J. Musculoskel. Nueron. Interact., 2001, 1(3), 193 -207, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Alternativamente, pueden evaluarse la densidad y la arquitectura ósea en roedores tratados con control o compuestos en modelos de osteopenia inducida por terapia (por ejemplo, glucocorticoides) (Yao, et al. Arthritis and Rheumatism, 2008, 58(6), 3485-3497 e *id.* 58(11), 1674-1686, los cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). Además, los efectos de los compuestos sobre la reabsorción y densidad ósea pueden evaluarse en los modelos de roedores de artritis descritos anteriormente (Ejemplo E). Los puntos finales para todos estos modelos pueden variar, pero a menudo incluyen evaluaciones histológicas y radiológicas, así como también inmunohistología y marcadores bioquímicos apropiados de remodelación ósea.

Se han descrito una serie de realizaciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden realizarse varias modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

65

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de preparación de un compuesto de Fórmula I:

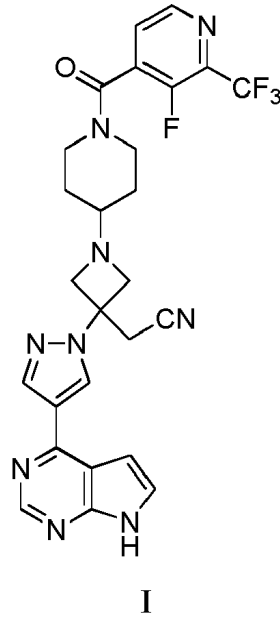
5

10

15

20

25



o una sal del mismo, que comprende:

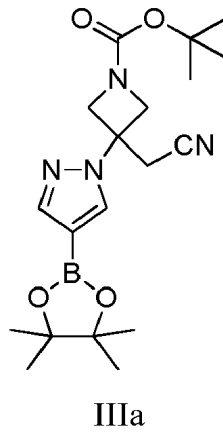
30

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula IIIa:

35

40

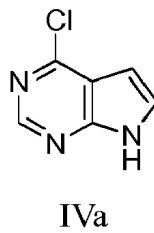
45



50

con un compuesto de Fórmula IVa:

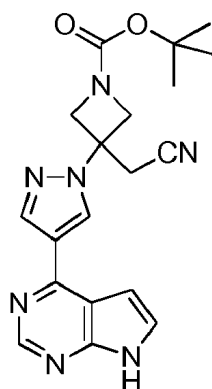
55



60

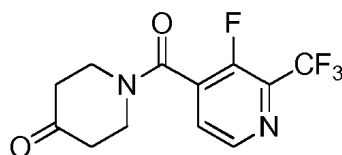
bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para formar un compuesto de Fórmula IIa:

65



IIa;

20 desproteger el compuesto de Fórmula IIa por reacción con ácido clorhídrico para formar sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo; y hacer reaccionar la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo con un compuesto de fórmula VI:



VI

en presencia de un agente reductor para formar un compuesto de Fórmula I, o una sal del mismo.

35 **2.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las condiciones de acoplamiento de Suzuki comprenden calentar una mezcla de la reacción que comprende el compuesto de Fórmula IIIa, el compuesto de Fórmula IVa, un catalizador de acoplamiento de Suzuki, una base y un componente solvente.

40 **3.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el catalizador de acoplamiento de Suzuki es:

- (a) Pd(dppf)₂Cl₂, [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II), tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), o tetrakis(tri(o-tolil)fosfina)paladio (0); o
 (b) [1,1'-bis(diciclohexilfosfino)ferroceno]dicloropalladio (II).

45 **4.** El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que la base es:

- (a) carbonato de sodio, carbonato de potasio o fluoruro de cesio; o
 (b) fluoruro de cesio.

50 **5.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la base es fluoruro de cesio y está presente en 3 equivalentes o más en base al compuesto de Fórmula IVa.

6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el componente solvente comprende *tert*-butanol y agua.

55 **7.** El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los compuestos de Fórmula IIIa y IVa están presentes en aproximadamente una relación molar de 1:1.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ácido clorhídrico está presente en una cantidad de 5 a 8 equivalentes en base al compuesto de Fórmula IIa.

60 **9.** El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 8, en el que dicha reacción de sal de clorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo con un compuesto de Fórmula VI se lleva a cabo en presencia de por lo menos dos equivalentes de una segunda base.

65

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la segunda base es:

- (a) una amina terciaria; o
- (b) trietilamina.

5

11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el agente reductor es:

- (a) cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio; o
- (b) triacetoxiborohidruro de sodio.

10

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el agente reductor es triacetoxiborohidruro de sodio y se usa más de 1 equivalente de triacetoxiborohidruro de sodio en base a la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo.

15

13. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que se usa más de 1 equivalente del compuesto de Fórmula VI en base a la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo.

20

14. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la reacción de la sal de diclorhidrato de 2-(3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)azetidín-3-il)acetonitrilo con un compuesto de Fórmula VI se realiza en un solvente diclorometano.

25

15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además hacer reaccionar el compuesto de Fórmula I con ácido adípico para formar la sal de adipato del compuesto de Fórmula I.

30

35

40

45

50

55

60

65