



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 283**

51 Int. Cl.:
C07D 271/06 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08843687 .8**
96 Fecha de presentación : **14.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2205575**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2010**

54 Título: **Un compuesto novedoso de α (N-sulfonamido)acetamida como un inhibidor de producción de péptido β amiloide.**

30 Prioridad: **31.10.2007 US 984118 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.06.2011

73 Titular/es: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
Route 206 and Province Line Road
Princeton, New Jersey 05843-4000, US

72 Inventor/es: **Starrett, Jr., John E.;**
Gillman, Kevin W. y
Olson, Richard E.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 283 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).

DESCRIPCIÓN

Un compuesto novedoso de alfa-(N-sulfonamido)acetamida como un inhibidor de producción de péptido beta amiloide

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que tiene propiedades de fármaco y que afectan biológicamente, sus composiciones farmacéuticas, procesos de las mismas y procedimientos de uso. El compuesto novedoso posee una inhibición única de producción de péptido A β , actuando por lo tanto para evitar la acumulación de péptidos A β y/o depósitos de proteína amiloide en el cerebro, y es útil en el tratamiento o retraso de la aparición de la enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Down, deterioro cognitivo leve y otras afecciones asociadas con el péptido β -amiloide.

Antecedentes

15 La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que comienza con pérdida de memoria y progresa hasta incluir deterioro cognitivo severo, comportamiento alterado, y función motora decrecida (Grundman, M. y col., Arch Neurol. (2004) 61: 59-66; Walsh, D.M. y col., Neuron (2004) 44: 181-193). Es la forma más común de demencia y representa la tercera causa líder de muerte después de trastornos cardiovasculares y cáncer. El coste de la AD es enorme e incluye el sufrimiento de pacientes y familias y la pérdida de productividad de pacientes y cuidadores. No está disponible actualmente ningún tratamiento que evite de forma efectiva la AD o revierta de forma efectiva los síntomas clínicos y la patofisiología subyacente.

20 Un diagnóstico definitivo de AD para un paciente demente requiere una evaluación histopatológica del número y localización de placas neuríticas y enredos neurofibrilares tras autopsia (recomendaciones consenso para el diagnóstico postmortem de la enfermedad de Alzheimer. Neurobiol Aging (1997) 18: S1-2). Se observan alteraciones similares en pacientes con Trisomía 21 (síndrome de Down). Las placas constan principalmente de péptidos β -amiloides (A β) que están formados por una escisión proteolítica por etapas de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante enzima de escisión de APP de sitio β (BACE), para generar el extremo N-terminal, y secretasa γ , para generar el C-terminal (Selkoe, D.J., Physiol Rev. (2001) 81: 741-766). Secretasa γ es un complejo de proteína transmembrana que incluye Nicastrina, APH-1, PEN-2, y bien Presenilina-1 (PS-1) o bien Presenilina-2 (PS-2) (Wolfe, M.S. y col., Science (2004) 305: 1119-1123). Se cree que PS-1 y PS-2 contienen los sitios catalíticos de la secretasa γ .

30 A β 40 es la forma más abundante de A β sintetizada (80-90%), mientras que A β 42 está más estrechamente relacionada con la patogénesis de AD. En particular, las mutaciones en los genes APP, PS-1, y PS-2 que conducen a formas familiares, raras de AD implican agregados de A β 42 como las especies tóxicas principales (Selkoe, D.J., Physiol Rev., (2001) 81: 741-766). La evidencia actual sugiere que la A β 42 oligomérica, protofibrilar e intracelular juega un papel significativo en el proceso de la enfermedad (Cleary, J.P. y col., Nat Neurosci. (2005) 8: 79-84). Los inhibidores de las enzimas que forman A β 42, tales como secretasa γ , representan productos terapéuticos potenciales que modifican enfermedades para el tratamiento de AD.

40 La secretasa γ escinde múltiples proteínas transmembrana de tipo I además de APP (Pollack, S.J. y col., Curr Opin Investig Drugs (2005) 6: 35-47). Aunque el significado fisiológico de la mayoría de estos eventos de escisión es desconocido, la evidencia genética indica que la escisión de la secretasa γ de Notch se requiere para la señalización de Notch (Artavanis-Tsakonas, S. y col., Science (1999) 284(5415): 770-6; Kadesch, T.; Exp Cell Res. (2000) 260(1): 1-8). En roedores dosificados con inhibidores de secretasa γ , la toxicidad relacionada con fármacos se ha identificado en el tracto gastrointestinal (GI), timo, y bazo (Searfoss, G.H.; Jordan y col., J Biol Chem. (2003) 278: 46107-46116; Wong, G.T. y col., J Biol Chem. (2004) 279: 12876-12882; Milano, J. y col., Toxicol Sci. (2004) 82: 341-358). Estas toxicidades están probablemente ligadas a la inhibición de la señalización Notch (Jensen, J. y col., Nat Genet. (2000), 24: 36-44).

45 La identificación de toxicidad basada en mecanismos suscita la cuestión de si se puede lograr un índice terapéutico aceptable con inhibidores de secretasa γ . La inhibición selectiva de formación de A β durante el procesamiento de Notch, farmacocinética, disposición de fármacos y/o farmacodinámicas específicas de tejido podrían impactar margen terapéutico.

50 La evidencia sugiere que una reducción en los niveles de A β mediante inhibición de secretasa γ puede evitar la aparición y progresión de AD (Selkoe, D. Physiol. Rev. (2001) 81: 741-766; Wolfe, M., J. Med. Chem. (2001), 44: 2039-2060). Hay datos emergentes para el papel de A β en otras enfermedades, incluyendo deterioro cognitivo leve (MCI), síndrome de Down, angiopatía cerebral amiloide (CAA), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), y degeneración macular relacionada con la edad. Ventajosamente, los compuestos que inhiben secretasa γ y reducen producción de A β se podrían usar para tratar éstas u otras enfermedades dependientes de A β .

60 La producción en exceso y/o la eliminación reducida de A β causa CAA (Thal, D. y otros, J. Neuropath. Exp. Neuro. (2002) 61: 282-293). En estos pacientes, los depósitos amiloides vasculares causan degeneración de paredes vasculares y aneurismas que pueden ser responsables del 10-15% de apoplejías hemorrágicas en pacientes mayores. Como en AD, las mutaciones en el gen que codifica A β conducen a una forma de aparición temprana de CAA, referida como hemorragia cerebral con amiloidosis del tipo holandés, y los ratones que expresan esta proteína mutante desarrollan CAA que es similar a pacientes. Compuestos que específicamente se dirigen a secretasa γ podrían reducir o evitar CAA.

La DLB se manifiesta con alucinaciones visuales, ilusiones, y parkinson. De forma interesante, las mutaciones familiares de la AD que causan depósitos de A β pueden causar también cuerpos de Lewy y síntomas de DLB

(Yokota, O. y col., *Acta Neuropathol (Berl)* (2002) 104: 637-648). Además, los pacientes esporádicos de DLB tienen depósitos de A β similares a aquellos en AD (Deramecourt, V. y col., *J Neuropathol Exp Neurol* (2006) 65: 278-288). Basados en estos datos, A β probablemente conduce a patología de cuerpos de Lewy en DLB y, por lo tanto, los inhibidores de secretasa γ podrían reducir o evitar la DLB.

5 Aproximadamente el 25% de los pacientes de ALS tienen demencia o afasia significativas (Hamilton, R.L. y col., *Acta Neuropathol (Berl)* (2004) 107: 515-522). La mayoría (~60%) de estos pacientes, designados ALS-D, contienen inclusiones positivas de ubiquitina compuestas principalmente de la proteína TDP-43 (Neumann, M. y col., *Science* (2006) 314: 130-133). Aproximadamente el 30% de los pacientes de ALS-D tienen placas amiloides consistentes con demencia causada por A β (Hamilton, R.L. y col., *Acta Neuropathol (Berl)* (2004) 107: 515-522). Estos pacientes serían identificables con agentes de formación de imagen de amiloide y potencialmente tratables con inhibidores de secretasa γ .

10 La IBM es una enfermedad del músculo esquelético rara degenerativa relacionada con la edad. La aparición de depósitos de A β en músculo con IBM y la recapitulación de varios aspectos de la enfermedad dirigiendo sobreexpresión de APP a músculo en ratones transgénicos sustenta el papel de A β en IBM (revisado en Murphy, M.P. y col., *Neurology* (2006) 66: S65-68). Los compuestos que específicamente se dirigen a secretasa γ podrían reducir o evitar IBM.

20 En la degeneración macular asociada con la edad, se ha identificado a A β como uno de varios componentes de las drusas, depósitos extracelulares debajo del epitelio pigmentario retinal (RPE) (Anderson, D.H. y col., *Exp Eye Res* (2004) 78: 243-256). Un estudio reciente ha mostrado vínculos potenciales entre A β y degeneración macular en ratones (Yoshida, T. y col., *J Clin Invest* (2005) 115: 2793-2800). Se han encontrado incrementos en deposición de A β y cataratas supranucleares en pacientes de AD (Goldstein, L.E. y col., *Lancet* (2003) 361: 1258-1265). Los compuestos que específicamente se dirigen a secretasa γ podrían reducir o evitar degeneración macular relacionada con la edad.

25 En base al papel de la señalización de Notch en tumorigénesis, los compuestos que inhiben secretasa γ pueden ser útiles también como agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer (Shih, I.-M., y col., *Cancer Research* (2007) 67: 1879-1882).

30 Smith, y col. en la Solicitud Internacional WO 00/50391, publicada el 31 de agosto de 2000, describe una serie de compuestos de sulfonamida que pueden actuar modulando la producción de proteína amiloide β como un medio de tratar una diversidad de enfermedades, especialmente enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades relativas a la deposición de amiloide.

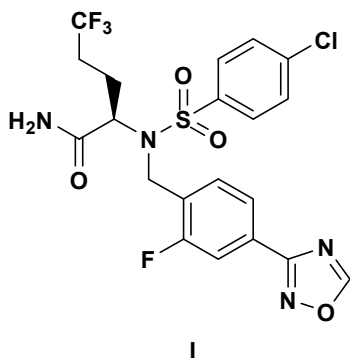
La Patente Japonesa N $^{\circ}$: 11343279, publicada 14 de diciembre de 1999 describe una serie de derivados de sulfonamida que son inhibidores de TNF-alfa útiles para tratar enfermedades autoinmunes.

35 Parker, y col. en la Solicitud Internacional WO 03/053912, publicada el 3 de julio de 2003, describe una serie de derivados de α -(N-sulfonamido)acetamida como inhibidores de β -amiloide que son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras afecciones asociadas con péptido β -amiloide.

40 El compuesto novedoso de la presente invención que cae dentro de la definición de la Fórmula en el documento WO 03/053912 no está revelado ni descrito por Parker, y col. Sorprendentemente, se ha descubierto que la (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida posee atributos únicos que la hacen útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades asociadas con péptido β -amiloide.

Descripción de la invención

45 La presente invención se refiere a (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que tiene la Fórmula I, sus formulaciones farmacéuticas, y su uso en inhibir la producción de A β en pacientes que sufren de o susceptibles a enfermedad de Alzheimer (AD) u otros trastornos asociados con péptido β -amiloide.



En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en asociación con un coadyuvante, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En aún otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento, alivio o para retardar la aparición de trastornos asociados con péptido β -amiloide, especialmente enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral, deterioro cognitivo leve, y síndrome de Down que comprende administrar conjuntamente con un coadyuvante, vehículo o diluyente convencional una cantidad terapéuticamente efectiva de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida o solvato o hidrato de la misma.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que comprende la etapa de hacer reaccionar (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida con 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol en un disolvente orgánico inerte en presencia de una base y preferiblemente una base inorgánica tal como carbonato de cesio.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)-fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida con hidroxilamina, y

(b) tratar la (R)-2-(4-cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxicarbamimidoil)bencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida resultante con ortoformiato de trietilo en un disolvente orgánico inerte en presencia de un catalizador ácido.

Como el compuesto de la presente invención posee un átomo de carbono asimétrico, la presente invención incluye el racemato así como las formas enantiómeras individuales del compuesto de Fórmula I e intermedios quirales y racémicos como se describen en el presente documento. El uso de una designación simple tal como (R) o (S) se desea para incluir mayoritariamente un estereoisómero. Las mezclas de isómeros se pueden separar en isómeros individuales de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo cristalización fraccionada, cromatografía de adsorción u otros procedimientos de separación adecuados. Los racematos resultantes se pueden separar en antípodas en la manera usual después de la introducción de agrupamientos formadores de sal adecuados, por ejemplo formando una mezcla de sales diastereoisómeras con agentes formadores de sal ópticamente activos, separando la mezcla en sales diastereoisómeras y convirtiendo las sales separadas en compuestos libres. Las formas enantiómeras se pueden separar también mediante fraccionamiento a través de columnas quirales de cromatografía líquida de alta presión.

En el procedimiento de la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" quiere decir la cantidad total de cada componente activo del procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio del paciente significativo, es decir, curación de afecciones asociadas con péptido β -amiloide. Cuando se aplican a un ingrediente activo individual, administrado solo, los términos se refieren a ese ingrediente solo. Cuando se aplican a una combinación, los términos se refieren a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, si se administran en combinación, en serie o simultáneamente. Los términos "tratar, tratando, tratamiento" como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones quieren decir evitar, retardar, suprimir o mejorar enfermedades asociadas con péptido β -amiloide.

En todavía aún otra realización de la invención, el compuesto de Fórmula I se puede usar en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevención/supresión o mejora de las enfermedades o afecciones para las que es útil el compuesto de Fórmula I. Tales otros fármacos se pueden administrar mediante una vía y en una cantidad usada comúnmente para ello, contemporáneamente o secuencialmente con el compuesto de la presente invención. Cuando se usa el compuesto de Fórmula I contemporáneamente con uno o más fármacos distintos, se prefiere una composición farmacéutica que contenga tales fármacos además del compuesto de Fórmula I. De acuerdo con ello, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas que también contienen uno o más ingredientes activos diferentes, además de un compuesto de la Fórmula I. Ejemplos de otros ingredientes activos que se pueden combinar con (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida, administrados bien por separado o bien en las mismas composiciones farmacéuticas, para tratar enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a: la clase de fármacos que son inhibidores de colinesterasa, por ejemplo donepezilo (Aricept[®]), rivastigmina (Exelon[®]), galantamina (Reminyl[®], ahora Razadyne[®]); otros fármacos que son antagonistas de NMDA tales como memantina (Namenda[®]) e inhibidores de PDE4 tales como cilomilast (Ariflo[®]); la clase de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tal como R-flurbiprofeno (Flurizan[®]); los fármacos de estatina que bajan el colesterol tales como pravastatina, simvastatina, y atorvastatina; terapia inmune anti-amiloide y anti-A β ; compuestos que inhiben la agregación de A β , tales como esciloinositol y clioquinol; otros compuestos que inhiben o modifican producción o procesamiento de A β tales como inhibidores de secretasa γ , inhibidores de secretasa β , moduladores de secretasa γ , moduladores de A β , e inhibidores de GSK-3; compuestos que regulan recambio de A β tales como inhibidores de PAI-1; compuestos que regulan fosforilación de tau tales como inhibidores de GSK-3 y de CDK-5; agonistas de PPAR, tales como rosiglitazona; compuestos que regulan la renovación de tau o fósforo-tau, tales como inhibidores HSP90, inhibidores HDAC y terapia inmune antitau; y compuestos que estabilizan o se unen a microtúbulos, tales como derivados de taxano y derivados de epotilona; y compuestos que regulan la función mitocondrial tales como Dimebon.

En el tratamiento de cáncer, el compuesto de la presente invención se puede usar con agentes o tratamientos anticancerígenos conocidos. Tales agentes y tratamientos incluyen agentes citotóxicos/citostáticos, moduladores de receptor de andrógenos, moduladores de receptor de estrógenos, moduladores de receptor retinoide, inhibidores de prenil-proteíntransferasa, inhibidores de angiogénesis, agentes que interfieren con puntos de control del ciclo celular, y terapia de radiación. Además, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos inmunológicos tales como Lupus.

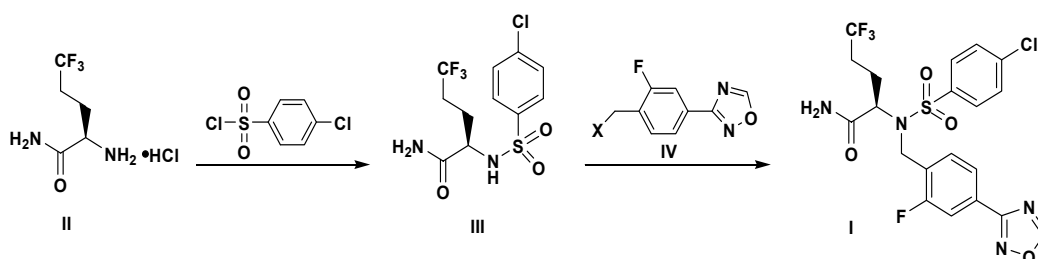
Los agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con el compuesto de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en el Vademécum estadounidense PDR, donde son aplicables o como se determinan de otra manera por alguien de habilidad normal en la técnica.

5 Sin embargo, se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente se determinará por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección a tratarse, la elección de compuesto a administrarse, la vía elegida de administración, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas de los pacientes.

Esquemas de Reacción Generales

10 El compuesto de la presente invención se puede preparar por una serie de rutas diferentes bien conocidas por alguien experto en la técnica de síntesis orgánica. El compuesto de Fórmula I se puede preparar mediante los procedimientos descritos en los Esquemas de Reacción 1-5. Las variaciones razonables de los procedimientos descritos, conjuntamente con procedimientos sintéticos que serían evidentes para alguien experto en la técnica, se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

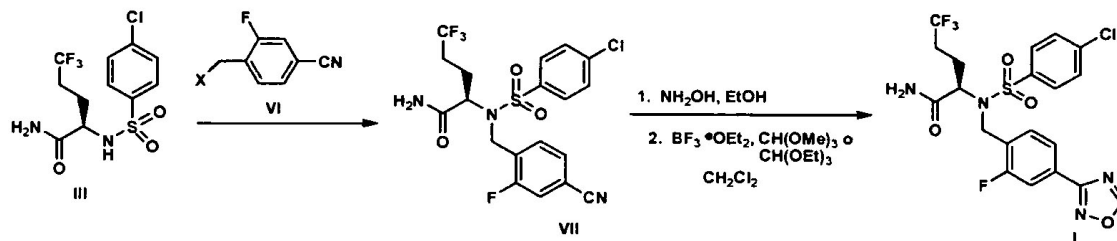
Esquema de Reacción 1



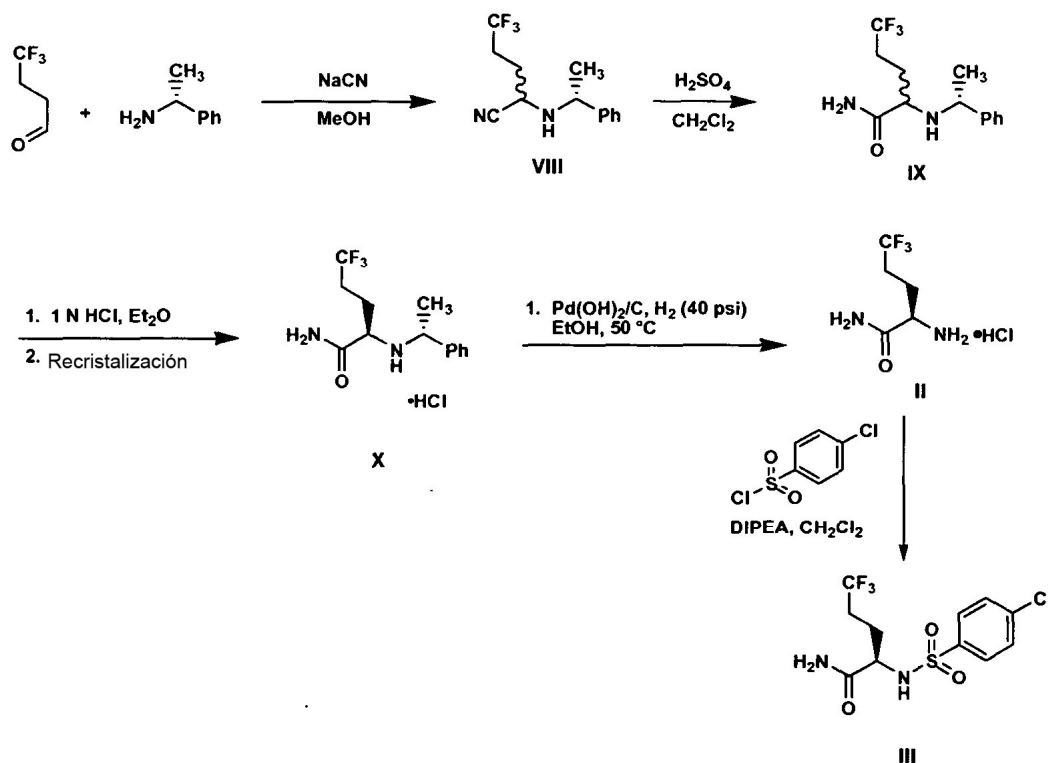
15 En un procedimiento de preparación ilustrado en el Esquema de Reacción 1, la (α -amino)acetamida de partida de Fórmula II que se usa en forma sustancialmente pura enantioméricamente se puede preparar mediante procedimientos de la bibliografía bien conocidos tales como usando el procedimiento de síntesis de Strecker asimétrico descrito en el Esquema de Reacción 3 para la conversión de trifluorobutiraldehído a la (α -amino)acetamida de Fórmula II, o alternativamente a partir de (R)-5,5,5-trifluoronorvalina (véase; I. Ojima, J. Org. Chem. (1989) 54: 4511-4522) y el procedimiento descrito en el Esquema de Reacción 4 seguido por los procedimientos generales para preparación de amida: R.C. Larock "Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Nueva York, 1989, páginas 972 – 976. La (α -amino)acetamida de Fórmula II se trata con una base adecuada y se sulfonila con cloruro de p-clorosulfonilo en un disolvente aprótico adecuado tal como CH_2Cl_2 a aproximadamente temperatura ambiente para proporcionar la (α -sulfonamido)acetamida de Fórmula III. Las bases adecuadas incluyen trietilamida, diisopropilamina, piridina y similares.

20 La conversión de compuesto de Fórmula III a la sulfonamida de Fórmula I se lleva a cabo en presencia de una base haciendo reaccionar la (α -sulfonamido)acetamida de Fórmula III con un agente alquilante de fluorobencil oxadiazol de Fórmula IV en un disolvente aprótico adecuado con o sin calentamiento. El fluorobencil oxadiazol de Fórmula IV se puede preparar fácilmente mediante procedimientos bien conocidos en la técnica en los que X es un grupo saliente y mediante el procedimiento descrito en el Esquema de Reacción 6. Las bases adecuadas para esta alquilación incluyen bases inorgánicas tales como carbonato de potasio y carbonato de cesio. Los disolventes preferidos incluyen DMF y acetonitrilo. El intervalo de temperaturas para la reacción es típicamente de 20°C a 100°C .

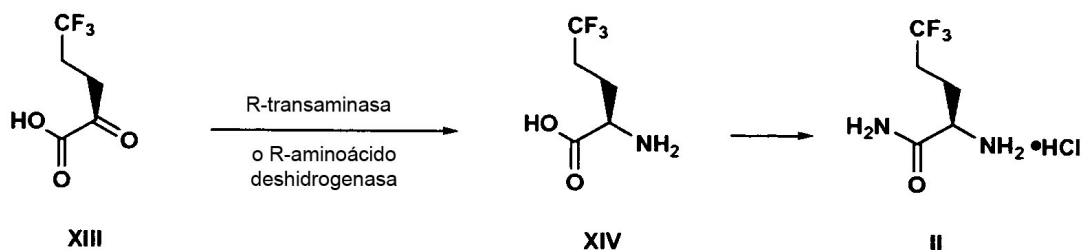
Esquema de Reacción 2



35 En otro procedimiento de preparación ilustrado en el Esquema de Reacción 2, el compuesto 1,2,4-oxadiazol de Fórmula I se prepara alquilando el compuesto de Fórmula III con derivado de 2-ciano-4-fluorobencilo de Fórmula VI en el que X es un grupo saliente en presencia de una base en un disolvente adecuado para producir el nitrilo de Fórmula VII. El compuesto deseado de Fórmula I se preparó después a partir del compuesto de nitrilo de Fórmula VII usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (ref.: Joule, J.A. y col., Heterocyclic Chemistry, 3ª ed., Chapman & Hall, Londres (1995) 452-456 y referencias citadas en lo mencionado). Por ejemplo, la reacción del nitrilo de Fórmula VII con hidroxilamina en un disolvente de alcohol tal como metanol o etanol a temperaturas hasta reflujo proporcionan una amida exima intermedia que se trata subsiguientemente con ortoformiato de trietilo en presencia de una fuente ácida tal como ácido trifluoroacético o eterato de trifluoruro de boro en un disolvente orgánico inerte tal como CH_2Cl_2 , acetonitrilo, tetrahidrofurano y similares para proporcionar el 1,2,4-oxadiazol de Fórmula I.

Esquema de Reacción 3

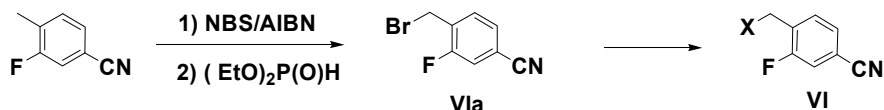
5 El Esquema de Reacción 3 describe la preparación de (α -amino)acetamida de F3rmula II partiendo de trifluorobutiraldehido comercialmente disponible y (R)- α -metilbencilamina bajo condiciones de Strecker con H_2SO_4 y fuente de cianuro tal como cianuro de sodio, cianuro de potasio, o trimetilsililcianuro en un disolvente adecuado tal como metanol para proporcionar el aminonitrilo de F3rmula VIII como una mezcla de diastereois3meros. El trifluorobutiraldehido de partida se puede preparar tambi3n mediante oxidaci3n de trifluorobutanol. La hidr3lisis del nitrilo de F3rmula VIII a la amida correspondiente de F3rmula IX se lleva a cabo con H_2SO_4 y neutralizaci3n de la reacci3n, seguido por acidificaci3n y recrystalizaci3n en un disolvente adecuado tal como metanol, isopropanol, acetato de etilo, 3ter metiltercbutilico, o mezclas de los mismos, proporcionando la amida de f3rmula X en exceso diastereoisom3rico de > 99%. El grupo bencilo puede retirarse entonces mediante hidrogenaci3n en presencia de un catalizador adecuado, tal como hidr3xido de paladio o paladio en carbono dando el amino3cido de F3rmula II que se puede sulfonilar con cloruro de p-clorosulfonilo proporcionando la sulfonamida de F3rmula III.

Esquema de Reacci3n 4

20 En otro procedimiento de preparaci3n, la (α -amino)acetamida de F3rmula II puede ser producida con estereoselectividad usando un proceso enzim3tico que empieza con H_2SO_4 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico como se ilustra en el Esquema de Reacci3n 4. La (R)-5,5,5-trifluoronorvalina de F3rmula XIV se puede preparar en forma sustancialmente enantiom3ricamente pura a partir del compuesto de F3rmula XIII usando enzima (R)-aminotransferasa comercialmente disponible mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la t3cnica. En un procedimiento alternativo, el proceso enzim3tico se puede llevar a cabo usando la enzima (R)-amino3cido deshidrogenasa comercialmente disponible. Los procedimientos enzim3ticos se llevan a cabo usando los procedimientos descritos m3s adelante y los procedimientos bien conocidos por los expertos en la t3cnica. La

conversión de la (R)-5,5,5-trifluoronorvalina de Fórmula XIV al compuesto de Fórmula II se puede llevar a cabo usando procedimientos generales para preparación de amidas bien conocidos en la técnica.

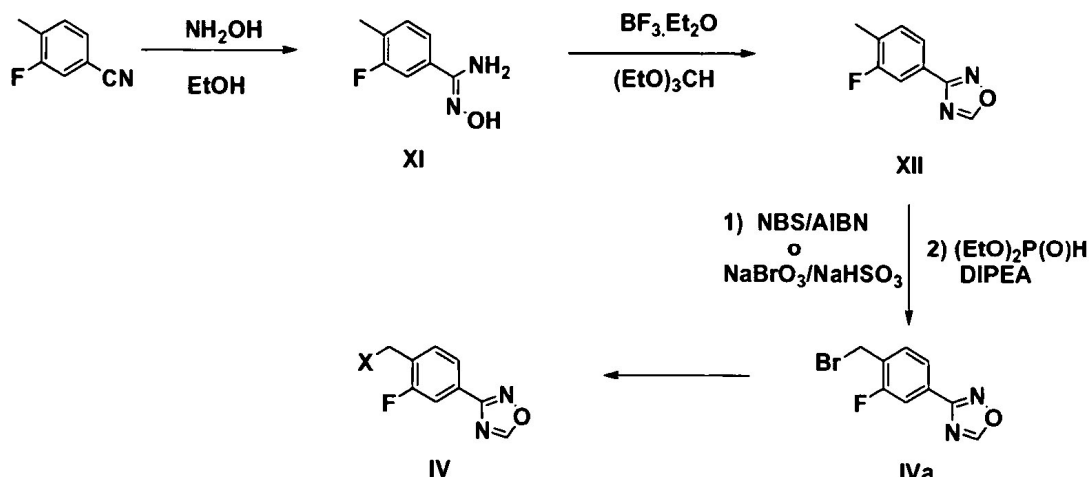
Esquema de Reacción 5



- 5 El bromuro bencílico de Fórmula VIa se puede preparar mediante bromación de 2-fluoro-4-cianotolueno comercialmente disponible con N-bromosuccinimida en un disolvente adecuado tal como diclorometano, dicloroetano o tetracloruro de carbono, usando un iniciador tal como AIBN como se ilustra en el Esquema de Reacción 5. Los procedimientos de bromación con alto rendimiento y, si se desea, el compuesto de Fórmula VIa se puede convertir fácilmente al compuesto de Fórmula VI en el que X es un grupo saliente mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

10

Esquema de Reacción 6



- 15 Como una alternativa al uso del compuesto de Fórmula VI en la secuencia lineal a la sulfonamida oxadiazol de Fórmula I descrita anteriormente en el Esquema de Reacción 2, la preparación del compuesto de Fórmula IV para usar en la vía convergente representada en el Esquema de Reacción 1 se muestra en el Esquema de Reacción 6. Tratamiento de 2-fluoro-4-cianotolueno comercialmente disponible con hidroxilamina a temperatura ambiente en un disolvente alcohólico proporciona amida oxima bruto de Fórmula XI, que se puede emplear directamente en la reacción subsiguiente. La ciclación de la amida oxima de Fórmula XI mediante tratamiento con éterato de trifluoruro de boro y ortoformiato de trietilo proporciona el oxadiazol de Fórmula XII en rendimiento de más del 90% en dos etapas. Como una alternativa al uso de trifluoruro de boro, la ciclación se puede llevar a cabo limpiamente usando ácido trifluoroacético como la fuente ácida. La bromación con N-bromosuccinimida en un disolvente adecuado tal como diclorometano, dicloroetano o tetracloruro de carbono usando un iniciador tal como AIBN proporciona compuesto monobromooxadiazol de Fórmula IVa. Si se desea evitar posibles mezclas de mono y dibromuros, la función tolijo de compuesto de Fórmula XI puede sobrebromarse deliberadamente con N-bromosuccinimida y AIBN para proporcionar el dibromuro correspondiente que se puede reducir con dietilfosfito para proporcionar el monobromuro de Fórmula IVa en rendimiento de más del 90%. La dibromación y la reducción se pueden llevar a cabo en un recipiente sin aislamiento del dibromuro en un rendimiento general de más del 90%. Alternativamente, el compuesto de Fórmula IVa se puede preparar también a partir del compuesto de Fórmula XII con bromato de sodio en exceso y bisulfito de sodio en un sistema disolvente de dos fases tal como acetato de etilo/agua, diclorometano/agua, acetato de butilo/agua, trifluorotolueno/agua y similares para proporcionar una mezcla de intermedios de mono- y dibromuro que se reducen in situ con fosfato de dietilo/diisopropilamina para proporcionar el monobromuro de Fórmula IVa. Si se desea, el compuesto de Fórmula IVa puede convertirse fácilmente en el compuesto de Fórmula IV en el que X es un grupo saliente mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica.

35

En otra realización, esta invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de Fórmula I en combinación con un coadyuvante, vehículo o diluyente farmacéutico

- 40 En aún otra realización, esta invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de trastornos en respuesta a la inhibición de péptido β -amiloide en un mamífero en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de Fórmula I o un solvato o hidrato del mismo.

En aún otra realización, esta invención se refiere a un procedimiento para tratar, aliviar o retrasar la aparición de enfermedad de Alzheimer, angiopatía cerebral amiloide, amiloidosis sistémica, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo holandés, demencia multiinfarto, deterioro cognitivo leve y síndrome de Down en un paciente en

necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de Fórmula I o solvato o hidrato del mismo.

Para uso terapéutico, el compuesto farmacológicamente activo de Fórmula I se administrará normalmente como una composición farmacéutica que comprende como el (o como un) ingrediente esencialmente activo al menos un compuesto tal en asociación con un vehículo sólido o líquido farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, con coadyuvantes farmacéuticamente aceptables y excipientes que emplean técnicas estándar y convencionales.

Las composiciones farmacéuticas incluyen formas farmacéuticas adecuadas para administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intradérmica e intravenosa), transdérmica, sublingual, bronquial o nasal. Así, si se usa un vehículo sólido, la preparación puede comprimirse, situarse en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o de pellas, o en la forma de un trocisco o pastilla. El vehículo sólido puede contener excipientes convencionales tales como agentes de unión, cargas, lubricantes de compresión, disgregantes, agentes humectantes y similares. El comprimido puede, si se desea, recubrirse con película mediante técnicas convencionales. Las preparaciones orales incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, adaptadas hechas de gelatina y un recubrimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener agentes activos mezclados con agentes de carga o aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos, o polietilenglicoles líquidos con o sin estabilizadores. Si se emplea un vehículo líquido, la preparación puede estar en la forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda, vehículo estéril para inyección, una suspensión líquida acuosa o no acuosa, o puede ser un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Las preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, agentes humectantes, vehículo no acuoso (incluyendo aceites comestibles), conservantes, así como agentes aromatizantes y/o colorantes. Para administración parenteral, un vehículo comprenderá normalmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque se pueden emplear soluciones salinas, soluciones de glucosa y similares. Se pueden usar también suspensiones inyectables, caso en el que se pueden emplear agentes de suspensión convencionales. Se pueden añadir también a las formas farmacéuticas parenterales conservantes convencionales, agentes tamponadores y similares. Para administración tópica o nasal, se usan en la formulación agentes penetrantes o de impregnación que son apropiados para la barrera particular para impregnarse. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica. Las composiciones farmacéuticas se preparan mediante técnicas convencionales apropiadas para la preparación deseada que contiene cantidades apropiadas del ingrediente activo, es decir, el compuesto de Fórmula I de acuerdo con la invención. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, 17ª edición, 1985.

La dosificación del compuesto de Fórmula I para lograr un efecto terapéutico dependerá no sólo de factores tales como la edad, peso y sexo del paciente y modo de administración, sino también del grado de inhibición de A β deseado y de la potencia del compuesto de Fórmula I para el trastorno particular o enfermedad implicada. Se contempla también que el tratamiento y dosificación del compuesto de Fórmula I se puede administrar en forma de dosis unitaria y que la forma de dosis unitaria se ajustaría de acuerdo con ello por alguien experto en la técnica para reflejar el nivel relativo de actividad. La decisión en cuanto a la dosificación particular a emplearse (y el número de veces para administrarse por día) está dentro de la discreción del médico, y se puede variar mediante valoración de la dosificación en las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico deseado.

Una dosis adecuada del compuesto de Fórmula I o un composición farmacéutica del mismo para un mamífero, incluyendo el hombre, que padece, o que probablemente padece cualquier afección relacionada con producción de péptido A β como se describe en el presente documento, generalmente la dosis diaria será de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y preferiblemente, aproximadamente 0,1 a 2 mg/kg cuando se administra parenteralmente. Para administración oral, la dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg y preferiblemente de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal. El ingrediente activo se administrará preferiblemente en dosis iguales de una a cuatro veces al día. Sin embargo, usualmente se administra una dosis pequeña, y la dosificación se incrementa gradualmente hasta que se determina la dosificación óptima para el huésped bajo tratamiento. De acuerdo con la buena práctica clínica, se prefiere administrar el compuesto actual a un nivel de concentración que producirá un efecto antiamiloidé efectivo sin causar cualesquiera efectos secundarios dañinos o adversos. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente se determinará por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección a tratarse, la elección de compuesto de ser administrado, la vía elegida de administración, la edad, peso, y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

Datos biológicos

Transactivación de PXR

El receptor de pregnano X (PXR) es un receptor de hormona nuclear principalmente responsable de la inducción de citocromo P450 (CYP) 3A4, que juega un papel principal en metabolizar muchos fármacos clínicamente prescritos. Se conoce bien que la inducción de CYP3A4 puede causar bien interacción fármaco-fármaco incrementando la eliminación metabólica de sustratos de CYP3A4 coadministrados (Bertilsson, G. y col., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. (1998) 95: 12208-12213; Lehmann, J.M. y otros, J. Clin. Invest. (1998) 102: 1016-1023) o puede causar pérdida de exposición a fármaco debida a autoinducción. Caracterizar el potencial de inducción de descubrimiento o desarrollo de candidatos a fármacos ha llegado a ser un tamiz importante en toda la industria farmacéutica. Se usó un ensayo de transactivación de PXR para valorar el potencial de inducción de CYP3A4, y un ensayo de citotoxicidad de células HepG2 para controlar la interferencia de ensayo debida a citotoxicidad.

El medio de cultivo celular usado es DMEM. Lipofectamina 2000, PBS, tripsina-EDTA (0,25%), y penicilina-estreptomomicina se compraron a partir de GIBCO/Invitrogen (Carlsbad, CA). Se adquirió suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) de Sigma (San Luis, MO). Se adquirió suero bovino fetal tratado con carbón activo/dextrano (FBS) a

partir de Hyclone (Logan, UT). Se obtuvieron células HepG2 a partir de ATCC (Manassas, VA). Se generaron PXR-pcDNA3 humano e indicador de luciferasa conteniendo promotor de CYP3A4, CYP3A-Luc, en Bristol-Myers Squibb. Se compraron placas de 384 pocillos estándar negras de BD Biosciences (Lexington, KY). Se compró sustrato de luciferasa (Steady-Glo) de Promega (Madison, WI). El compuesto control rifampicina se compró de Sigma (San Luis, MO).

El cultivo de células HepG2 se lleva a cabo en matraces T175 usando DMEM que contiene FBS al 10%. La mezcla de transfección contiene 1 µg/ml de DNA de plásmido PXR-pcDNA3, 20 µg/ml de DNA de plásmido Cyp3A-Luc, 90 µl/ml de Lipofectamina 2000, y medio libre de suero. Después de incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla de transfección (1 ml por matraz) se aplica a las células en el medio fresco (20 ml por matraz), y los matraces se incuban a 37°C (CO₂ al 5%) durante toda una noche.

Las células en cada matraz se lavan con PBS y se añaden 4 ml de Tripsina-EDTA (0,25%) y se incuban durante un minuto a temperatura ambiente. La tripsina se aspira aparte después y los matraces se incuban durante cinco minutos adicionales a temperatura ambiente. Los matraces se golpean con los dedos vigorosamente para descomponer los agregados celulares. Después de la adición de 10 ml de DMEM conteniendo un 5% de FBS tratado con carbón/dextrano, la mezcla entera se transfiere a tubos cónicos. La reserva de células en suspensión se disgrega adicionalmente pipeteando a través de una punta de pipeta de 1 ml. Las células se cuentan después y se diluyen en medios a 3,0 x 10⁵ células/ml. Se añaden cincuenta µl de mezcla celular a cada pocillo de una placa de 384 pocillos negra estándar que contiene 0,25 µl del compuesto de prueba disuelto en DMSO al 100%. Las placas se incubaron a 37°C (CO₂ al 5%) durante toda una noche antes de que se añadan 25 µl de sustrato de luciferasa (Steady-Glo, Promega) a cada pocillo. Después de quince minutos, las placas se leen en un lector de placa Viewlux (Perkin-Elmer).

La rifampicina (10 µM), un agonista bien conocido de PXR, está incluido en cada placa como un estándar interno y control positivo. Los datos se expresaron después como activación porcentual (%Act), donde la señal total es la señal de la rifampicina 10 µM y la señal de blanco es aquella del vehículo de DMSO.

$$\%Act = \frac{\text{Señal del compuesto} - \text{Señal del blanco}}{\text{Señal total} - \text{Señal del blanco}} \times 100\%$$

Los compuestos se probaron a diez concentraciones (50 µM–2,5 nM, dilución en serie 1:3), y se usó XL-Fit (IDBS, Inc.) para ajuste de curva. Se indican concentraciones de un compuesto a las que tiene lugar la activación al 20% y al 60% (EC_{20A} y EC_{60A}, respectivamente).

El receptor de pregnano-X humano es principalmente responsable de la inducción de CYP3A4, así como CYP2B6, CYP2C8/9, enzimas de fase 2 tales como UGT, y diversos vehículos tales como P-gp, MRP2, y OATP2. El ensayo anterior demostró que (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida tenía un EC_{20A} (20% de la respuesta de Rifampicina a 10 µM) de 6,9 µM y una EC_{60A} (60% de la respuesta de Rifampicina a 10 µM) de más de 16,7 µM en el ensayo de transactivación de hPXR. Estos resultados sugieren que (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida puede tener el potencial para ser un inductor de CYP3A4 humano a través de la activación de hPXR.

Inducción de Citocromo P450 en Células Fa2N-4

La capacidad de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida para inducir ARNm de CYP3A4 se evaluó in vitro usando la línea celular Fa2N-4. La célula Fa2N-4 es una línea de hepatocitos humanos inmortalizada que se creó usando el antígeno T del virus de simios 40 (SV40) como el gen que se inmortaliza, mientras que retiene expresión basal e inducibilidad de diversas isoformas de CYP, incluyendo CYP3A4. Las células Fa2N-4 y los Medios F de Soporte MEF se proporcionaron por Xenotech, LLC (Lenexa, Kansas).

Las células Fa2N-4 se suministraron en placas de 12 pocillos, recubiertas de colágeno a una densidad de siembra de 0,67 x 10⁶ células por pocillo. Sobre los receptores de las células, los medios se cambiaron y las células se mantuvieron durante toda una noche en un incubador humidificado, abastecido con CO₂. Después de este periodo de adaptación, las células se examinaron bajo un microscopio óptico y se hizo una determinación de si las células eran morfológicamente normales y adecuadas para uso. Durante el periodo de tratamiento, las células se inspeccionaron visualmente en una base diaria; se documentaron morfología celular, confluencia, y signos de toxicidad debidos al artículo de prueba como fue necesario. Los cultivos celulares se trataron con 4 concentraciones (0,5, 2, 8, y 20 µM en incubación final) de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida, y un control de vehículo disolvente (DMSO al 0,1%) por triplicado. Se usó rifampicina (10 µM), un inductor CYP3A4 prototípico, como el control positivo. Las células Fa2N-4 se expusieron a los artículos de prueba durante un total de 3 días. El medio de cultivo se reemplazó diariamente con medio reciente que contiene los artículos de prueba. Después de un total de ~72 horas de exposición, el medio se aspiró y las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato reciente antes de añadir el tampón de lisis celular (Qiagen, Valencia, CA).

La capacidad de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-

trifluoropentanamida para inducir expresión de ARNm de CYP3A4 se examinó en hepatocitos humanos inmortalizados Fa2N-4. El tratamiento de hepatocitos Fa2N-4 con rifampicina (10 μ M) durante 3 días causó un incremento significativo (12 veces) en expresión de ARNm de CYP3A4 celular, indicando que las células estaban funcionando apropiadamente. La incubación de los hepatocitos con (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida durante 3 días dio como resultado un incremento dependiente de concentración en expresión de ARNm de CYP3A4, alcanzando 2,6 veces por encima del control de vehículo a la concentración más alta probada (20 μ M). Esta magnitud de inducción fue equivalente al 22% de la respuesta de inducción causada por rifampicina, sugiriendo que (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida podría inducir moderadamente CYP3A4 a concentraciones mayores que 20 μ M. La inducción relativamente mínima de CYP3A4 (\leq 2,0 veces) se observó a concentraciones menores de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (\leq 8,0 μ M).

Estabilidad Metabólica en Microsomas Hepáticos

Se obtuvieron microsomas hepáticos de ratón, rata, perro, ser humano y macaco de Java a partir de BD Gentest (Woburn, MA). Los números de lote fueron 13 (ratón), 8 (rata), 8 (perro), 19 y 26 (ser humano), y 3 (macaco de Java). El metabolismo oxidativo de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida se estudió en microsomas hepáticos bajo tres grupos de condiciones. Las mezclas de incubaciones de ser humano y perro (volumen total 3 ml, contenido en disolvente orgánico 0,3%) contenían (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (1 μ M), proteína microsómica (1 mg/ml), NADPH (1 mM), tampón de cloruro de Tris (100 mM, pH 7,4), y cloruro de magnesio (3,3 mM). La reacción, llevada a cabo por triplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguida por incubación a 37°C durante 50 minutos. Las alícuotas de muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos y la reacción se desactivó mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Las mezclas de incubaciones de macaco de Java y rata (volumen total 3 ml, contenido en disolvente orgánico 0,3%) contenían (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (1 μ M), proteína microsómica (0,1 mg/ml), NADPH (1 mM), tampón de cloruro de Tris (100 mM, pH 7,4), y cloruro de magnesio (3,3 mM). La reacción, llevada a cabo por triplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguida por incubación a 37°C durante 50 minutos. Las alícuotas de muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos y la reacción se desactivó mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Las mezclas de incubaciones de ratón y macaco de Java (volumen total 3 ml, contenido en disolvente orgánico 0,3%) contenían (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (1 μ M), proteína microsómica (0,1 mg/ml), NADPH (1 mM), tampón de cloruro de Tris (100 mM, pH 7,4), y cloruro de magnesio (3,3 mM). La reacción, llevada a cabo por duplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguida por incubación a 37°C durante 40 minutos. Las alícuotas de muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos y la reacción se desactivó mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Para todos los estudios, se analizaron las muestras inmediatamente mediante un procedimiento de CL/EM. La velocidad de desaparición parental se calculó a partir de las razones de área de pico de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en cada punto temporal.

La eliminación intrínseca hepática (CL_h, int, ml/min/kg) de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en diversas especies se estimó a partir de datos de microsomas hepáticos usando el procedimiento descrito por Houston JB., *Biochem Pharmacol* 1994;47:1469-1479; Iwatsubo, y col., *Pharmacol Ther* (1997) 73:147-171; y Obach y col., *J Pharmacol Exp Ther* (1997) 283:46-58.

La velocidad de metabolismo in vitro se determinó para (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en presencia de microsomas de hígado fortalecidos con NADPH de diversas especies. El compuesto de la presente invención (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (1 μ M) se metabolizó a una velocidad de 690, 630, 40, 495 y 32 pmol/min/mg de proteína en presencia de microsomas de ratón, rata, perro, macaco de Java, y de ser humano, respectivamente. Cuando las velocidades de consumo de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida se llevaron a la escala de eliminación in vivo, los valores de eliminación in vivo (suero) predichos de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida fueron aproximadamente 87, 52, 14, 39 y 8 ml/min/kg en ratón, rata, perro, macaco de Java y ser humano, respectivamente. Estos datos sugieren que (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida se anticipa que es un compuesto de eliminación baja en ser humano.

Farmacología in vitro

Ensayo de Unión de Presenilina

Se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento de radioligandos con [³H]-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida usando un procedimiento descrito previamente para [³H]-(2R,3S)-2-isobutil-N1-((S)-2-oxo-1-(3-fenoxibencil)azepan-3-il)-3-propilsulfonamida (RE987, compuesto A [Seiffert D, y col., Presenilin-1 and -2 are molecular targets for γ -secretase inhibitors. *J. Biol. Chem.* (2000) 275(44): 34086-34091]). Se llevaron a cabo varios experimentos para confirmar que [³H]-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida se une a secretasa γ . Primero, la unión específica de [³H]-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida a membranas de tipo salvaje y fibroblastos con eliminación génica PS-1/PS-2 mostró que [³H]-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida se unió específicamente a membranas de fibroblastos naturales pero no a fibroblastos con eliminación génica y que la señal específica sufrió competencia por inhibidores de secretasa γ estructuralmente distintos. Segundo, la farmacología de unión de [³H]-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida se investigó con varios inhibidores de secretasa γ . Estos resultados mostraron que el desplazamiento de unión de [³H]-(R)-4-((N-

(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida a membranas de THP-1 correlacionó bien con potencia de secretasa γ según se midieron ambos usando ensayos de unión de radioligandos previos e inhibición de formación de A β en células cultivadas.

5 Las células THP-1 se cultivaron en cultivos de Spinner en RPMI 1640 que contenían L-glutamina (Life Technologies Inc.) y β -mercaptoetanol 10 μ M a una densidad celular de 5×10^5 /ml. Las células se recogieron mediante centrifugación, y los sedimentos que contenían 2×10^8 células, se congelaron rápidamente en hielo seco/etanol y se almacenaron a -70°C antes de usar. En el día del ensayo, las células se descongelaron a 2×10^5 células por 10 ml de tampón de homogeneización constituido por HEPES 50 mM a pH 7,0 conteniendo un cóctel de inhibidor de proteasas de clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo 104 μ M, aprotinina 80 nM, leupeptina 2 μ M, bestatina 4 μ M, pepstatina A 1,5 μ M, y E-64 1,4 μ M (0,1% de cóctel inhibidor de proteasa P8340, Sigma-Aldrich, San Luis, MO) a 4°C . Las células se homogeneizaron usando un Politrón (Brinkman, Westbury, NY) a 18.000 rpm durante 15 segundos, después se centrifugó a 18.000 rpm, 4°C , 15 minutos en una centrifuga de Sorval RC5B. El sedimento resultante se resuspendió en tampón a 4°C proporcionando una concentración total de proteínas de 5 mg/ml. Para usar en el ensayo de unión, el homogeneizado celular se diluyó a una concentración de 300 μ g/ml en tampón de ensayo constituido por HEPES 50 mM pH 7,0, CHAPSO 0,1%. Se iniciaron los ensayos en placas de 96 pocillos de polipropileno (Costar, Cambridge, MA) mediante la adición de 200 μ l de homogeneizado celular a 50 μ l de tampón de ensayo conteniendo radioligando a 0,75 nM (^3H)-(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida, 110 Ci/mmol) y diversas concentraciones de compuestos no marcados, y se incubaron durante 1 hora a 37°C . La concentración de DMSO final fue 1%. La separación de unión de radioligando libre fue mediante filtración de filtros de fibra de vidrio GFF (Innotech Biosystems International, Lansing, MI) usando un cosechador de células Innotech. Los filtros se lavaron tres veces con 0,3 ml por pocillo de solución salina tamponada con fosfato pH 7,0 a 4°C y se midió la radiactividad usando un contador de centelleo líquido Wayac 1450 Micro beta (PerkinElmer, Boston, MA). Los valores de Ki de compuestos competidores se derivaron a través de la corrección de Cheng-Prusoff de valores CI_{50} calculados usando XLfit (IDBS, Guildford, Reino Unido).

15 El ensayo de unión de radioligandos anterior se usó para medir la afinidad de los compuestos al sitio objetivo de presenilina del complejo de secretasa γ . (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida causó una inhibición dependiente de dosis de unión de ^3H -(R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida a presenilina en membranas de THP-1. El análisis de experimentos múltiples produjo $\text{KI} = 0,48 \text{ nM} \pm 0,24 \text{ nM}$ (medio \pm Desviación Estándar, $n = 8$).

Inhibición de formación de A β en células cultivadas

35 Se ensayaron compuestos para inhibición de A β 40 o A β 42 en células usando clon de H4 APP751 SWE 8.20, desarrollado en Bristol-Myers Squibb, una línea de células de neuroglioma H4 que expresa de forma estable el mutante seco de APP751. Las células se mantuvieron en fase logarítmica por un paso dos veces semanalmente a dilución de 1:20. Para determinaciones de CI_{50} , se sembraron 30 μ l de células ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en medio DMEM que contiene BSA al 0,0125% (Sigma A8412) directamente en placas de compuesto de 384 pocillos (Costar 3709) conteniendo 0,1 μ l de compuesto diluido en serie en DMSO. Tras incubación durante 19 horas en CO_2 al 5% a 37°C , las placas se centrifugaron brevemente (1000 rpm, 5 min). Se transfirió una alícuota de 10 μ l de cada pocillo a una segunda placa de ensayo (Costar 3709) para medidas de A β 40. Se prepararon cócteles de anticuerpos de forma reciente mediante dilución en Tris-HCl 40 mM (pH 7,4) con BSA al 0,2% y se añadieron a placas de ensayo. Para medidas de A β 42, los anticuerpos específicos para el neopéptido A β 42 (565, desarrollado en Bristol-Myers Squibb; conjugado al reactivo de Wallac (Perkin Elmer)) y la secuencia N-terminal de péptido A β (26D6, desarrollada en SIBIA/Bristol-Myers Squibb; conjugada a APC (Perkin Elmer)) se mezclaron y se añadieron 20 μ l de la mezcla a cada pocillo de la placa de células incubadas produciendo una concentración final de 565 a 0,8 ng/pocillo y 26D6 a 75 ng/pocillo. Para las medidas de A β 40, se mezclaron anticuerpos específicos para el neopéptido A β 40 (TSD, desarrollado a Bristol-Myers Squibb; conjugado al reactivo de Wallac (Perkin Elmer)) y 26D6 como se describe anteriormente y se añadieron 20 μ l de la mezcla a alícuotas de 10 μ l que se pueden retirar previamente de la placa de células produciendo una concentración final de TSD a 1,6 ng/pocillo y de 26D6 a 17,5 ng/pocillo. Se sellaron placas de ensayo que contenían anticuerpos con lámina de aluminio y se incubaron durante toda una noche a 4°C . Se determinó señal usando un contador de Viewlux (Perkin Elmer) y se determinaron valores de CI_{50} usando ajuste de curva en CurveMaster (basado en Excel Fit).

55 La (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida inhibió potentemente la formación de A β 40 y A β 42 en células H4-8Sw. El análisis de experimentos múltiples produjo $\text{CI}_{50} = 0,30 \pm 0,15 \text{ nM}$ (media \pm Desviación Estándar, $n = 50$) para inhibición de A β 40 y $\text{CI}_{50} = 0,27 \pm 0,12 \text{ nM}$ (media \pm Desviación Estándar, $n = 45$) para inhibición de A β 42.

Inhibición de señalización Notch en células cultivadas

60 La actividad de secretasa γ se requiere para señalización mediante la familia Notch de receptores transmembrana. Dado que la inhibición de señalización de Notch causa efectos secundarios basados en mecanismos, indeseados, se usó un ensayo celular para señalización de Notch1- ΔE para realizar una prueba inversa de inhibidores de secretasa γ .

Una construcción de expresión de Notch1 de ratón se generó mediante PCR usando técnicas de biología molecular estándar y se verificó mediante secuenciación. Esta construcción se generó en el vector de pCDNA3.1+ Hyg (Invitrogen) modificado para contener una secuencia señal de 20 aminoácidos y una marca de myc C-terminal 7X. La secuencia señal se derivó de Notch1 de ratón; la marca de myc 7X se creó usando cebadores solapantes y se subclonó dentro de los sitios HindIII/XhoI del vector pCDNA3.1+ Hyg.

La construcción Notch1- ΔE de ratón contiene la secuencia señal de Notch1 de ratón y la mutación M1727V dentro

del dominio transmembrana para suprimir la iniciación de traducción interna. La secuencia codificante Notch1-ΔE de ratón de aminoácidos 1704 a 2193 se aisló a partir de una biblioteca de ADNc de Clon Rápido de Bazo de Ratón (Clontech) y se subclonó dentro del vector modificado que contenía la marca myc 7X y la secuencia señal como un fragmento de XbaI/HindIII.

5 Se mantuvieron células Hela en DMEM (GibcoBRL) que contenía FBS al 10% (GibcoBRL), Penicilina/Estreptomicina (GibcoBRL) y L-glutamina 2 mM (GibcoBRL). Las células se transfectaron transitoriamente usando TransIT-HelaMONSTER (Mirus) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se sembraron las células Hela (ATCC) 16 horas antes de la transfección a una densidad de 4×10^6 células por matraz T175 en medios de crecimiento Hela (DMEM (glucosa alta con HEPES) con glutamina, penicilina, estreptomicina y suero fetal bovino al 10%). Las células se transfectaron en medios de crecimiento con: 6 μg de plásmido de ratón Notch1-ΔE, 15,6 μg de plásmido vehículo (pCDNA3.1+ hyg), 14,4 μg de plásmido CBF1 (indicador de luciferasa) usando Reactivo de Transfección de HelaMonster (Mirus). La construcción del indicador de luciferasa CBF1 consta de 4X copias del elemento de unión CBF1 anterior en la secuencia al promotor de SV40 (Promotor pGL3, Promega). El indicador de luciferasa CBF1 se generó usando cebadores solapantes para generar la región de unión de CBF1 4X. Este fragmento se subclonó dentro de los sitios NheI/BglII de las construcciones de Promotor pGL3. La integridad de esta construcción se confirmó mediante secuenciación. Las disoluciones madre de ADN se diluyeron en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para transfección. Cinco o seis horas después de la adición de ADN, las células se eliminaron del matraz con Tripsina-EDTA y se resuspendieron en medios definidos (DMEM (glucosa alta con HEPES) con glutamina, penicilina, estreptomicina, seroalbúmina bovina al 0,0125% y aminoácidos no esenciales) a una concentración de 5×10^4 células/ml. Las células se sembraron en placas Clearview negras de 96 pocillos (Packard) a un volumen de 200 μl/pocillo (1×10^4 células) y se incubaron a 37°C durante 1,5 horas para permitir a las células adherirse a las placas. Los compuestos de prueba se diluyeron inicialmente en una placa de polipropileno de 96 pocillos en DMSO al 100%. Las disoluciones madre de compuesto de DMSO se diluyeron después 47,6 veces transfiriéndolas en una placa que contenía medios definidos produciendo concentración de DMSO al 2,1%. Las soluciones de compuesto diluidas (10 μl) se añadieron a la placa de células produciendo una concentración de DMSO al 0,1% final. Las placas de células que contenían compuesto se incubaron durante toda una noche a 37°C. Tras esta incubación durante toda una noche, los medios se retiraron suavemente y se añadieron a cada pocillo 25 μl de solución salina tamponada con fosfato (con calcio y magnesio). Los reactivos de Luc-Screen (Applied Biosystems) A y B se mezclaron en proporciones iguales y se añadieron a cada pocillo 50 μl de la mezcla. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que el respaldo negro se una al fondo de la placa y la señal se leyó en un TopCount (Packard). Las curvas de respuesta de concentración se ajustaron después usando regresión no lineal para determinar valores de Cl_{50} .

La actividad secretasa y se requiere para señalización mediante la familia de Notch de receptores transmembrana. Dado que la inhibición de señalización de Notch causa efectos secundarios basados en mecanismos, indeseados, el ensayo celular para señalización de Notch1-ΔE descrito anteriormente se usó para realizar una prueba inversa de inhibidores de secretasa y. El análisis de experimentos múltiples para inhibición de señalización de Notch1-ΔE mediante (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida produjo $Cl_{50} = 58 \pm 23$ nM (media ± Desviación Estándar, n = 58).

En base a las potencias celulares para inhibir Aβ40 (0,3 nM) y Notch (58 nM), la selectividad de Notch /APP para (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida es 193X (CI al 95% = 163-232).

Farmacología in vivo

ELISA de Abeta

Las especies de Aβ de animales se midieron usando ensayos de sandwich de ELISA. Se incluye aquí una breve descripción de estos ensayos dado que los detalles de los epítopos para los anticuerpos individuales determinan las especies de Aβ que se detectan. Los Aβ del ratón y la rata presentan una secuencia de Aβ común que es diferente del Aβ de seres humanos. Como resultado de estas diferencias de secuencia, los anticuerpos que reconocen la región N-terminal de Aβ de seres humanos, tal como 26D6, se unen débilmente al Aβ de roedores. Asimismo, los anticuerpos que se unen estrechamente al Aβ de roedores, tales como 252, unen débilmente al Aβ de seres humanos. Se desarrollaron dos ensayos para medir Aβ40 de roedores: 252-TSD y 4G8-TSD. El ensayo de TSD-4G8 puede medir no sólo Aβ40, sino también otros productos de escisión de BACE-secretasa y (Aβ11-40) y productos de escisión de secretasa α-secretasa y (P3). La tabla 1 resume los ensayos presentados en esta solicitud y su uso.

Tabla 1: Sumario de Pares de Anticuerpos Usados para Ensayar en Muestras In Vivo

Par de Anticuerpos	Tejidos Analizados	Especies de Aβ detectadas
252 - TSD	Cerebro de Rata	Aβx-40 ^a
4G8 - TSD	Plasma de Rata, CSF	Aβx-40 y P3

^a La localización exacta de "x" se desconoce. Mientras que 252 reconoce la región terminal de Aβ, se desconoce si el truncamiento aminoterminal de Aβ afecta la unión de 252. Esta incertidumbre es improbable que sea una cuestión en ratas porque el truncamiento N-terminal es raro.

Cada uno de estos ensayos se validó usando diversos procedimientos. Primero, se añadieron cantidades variables de Aβ sintético a la matriz biológica y el incremento en señal se comparó con aquel obtenido con Aβ sintético en solución tampón. Segundo, se agotó Aβ de la muestra biológica con anticuerpos anti-Aβ. Tercero, se ensayaron las muestras de animales que se trataron con dosis altas de un inhibidor de secretasa y. Un ensayo validado detectó eficientemente Aβ añadido exógenamente (recuperación del >80%), tuvo una señal grandemente reducida después

de inmunoagotamiento de A β (reducción del >80% comparada con controles no específicos), y tuvo una señal reducida a valores que se aproximan o se solapan con el valor de base del ensayo usando muestras de animales tratados con dosis altas de un inhibidor de secretasa y Los ensayos de A β optimizados y validados contenían aún una pequeña cantidad de la señal (de control de vehículo 5-20%) que no podría reducirse mediante anticuerpos anti-A β o mediante tratamiento con inhibidores de secretasa y. Esta señal es improbable que sea A β y se refiere consecuentemente al valor de base del ensayo. El valor de base del ensayo no se usa para corregir ninguna de las medidas de A β y consecuentemente, los valores comunicados son probablemente subestimaciones de la cantidad real de la inhibición de A β .

Se usó A β 40 como un sustituto de A β 42 in vivo. A β 40 es aproximadamente 10 veces más abundante en las muestras biológicas que A β 42. A β 40 es un buen sustituto para A β 42 en base a experimentos en células cultivadas donde A β 40 y A β 42 se inhiben de forma similar mediante (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida y otros inhibidores de secretasa y

Estudios en ratas

En vivo

Ratas Sprague-Dawley Harlan hembras (~200 – 250 g) se dosificaron diariamente mediante sonda oral con un vehículo de dosificación de PEG-400 al 99%, Tween-80 al 1% a 4 ml/kg en la mañana. Se hicieron soluciones de dosificación una vez al comienzo del estudio. Se usaron calentamiento a 56°C y sonicación para solubilizar compuesto en la solución de dosificación. Todos los procedimientos se hicieron de acuerdo con las directrices de ACUC. Las muestras sanguíneas terminales se obtuvieron mediante punción cardíaca después de eutanasia con CO₂ y se recogieron en tubos de EDTA. Se obtuvo plasma después de centrifugación. Se diseccionó tejido cerebral, se pesó y se congeló en hielo seco hasta análisis. Las muestras de CSF se centrifugaron para eliminar células o restos antes de dilución a 1:2 en BSA al 4% y se congelaron para análisis subsiguiente. Las muestras histopatológicas se situaron en formalina tamponada de forma neutral antes de procesar. Las muestras recogidas para ocupación se recubrieron en matriz embebida, y se congelaron a -25°C a -30°C en un baño de 2-metilbutano seguido por hielo seco. En plasma vivo se obtuvieron muestras usando sangrado retroorbital.

Ensayo Abeta40 de Cerebro

Se homogeneizó cerebro de rata (la mitad de un hemisferio) usando un politrón a 4 ml/g en PBS, pH 7,8, CHAPS al 2%, inhibidores de proteasa completos (Roche). Los residuos grandes se retiraron mediante centrifugación durante 30 minutos a 20.800 x g y el sobrenadante resultante se diluyó 1:2 en PBS, BSA al 2,5%. Se incubaron placas de ELISA Microlite II blancas (Thermo Electron) con anticuerpo TSD9S3.2 a 50 μ g/ml en PBS durante 1 hora a 37°C. Las placas se bloquearon con 200 μ l de seroalbúmina bovina al 5% (BSA; p/v preparado en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placa y después se lavaron 5 veces con 500 μ l/pocillo de PBS, Tween-20 al 0,05%. Los homogeneizados de cerebro aclarados se cargaron en 6 replicados de 50 μ l por pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron como antes y después se incubaron con anticuerpo 252 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Biosource) diluido 1:2000 en PBS, Tween al 0,05%, BSA al 0,1% durante 1 hora. Tres replicados contenían el anticuerpo 252-HRP sólo y tres replicados contenían el anticuerpo 252-HRP con A β 1-14 de rata a 1 μ g/ml (Anaspec) que compitió específicamente con el anticuerpo unido; esta señal antecedente se sustrajo a partir de la señal total para proporcionar la señal específica. El anticuerpo 252-HRP unido se detectó usando sustrato Pierce Supersignal Pico Chemiluminescent durante 10 minutos y se cuantificó usando un Packard TopCount. Las muestras se normalizaron a una referencia de homogeneizado cerebral situado en cada placa. En base a las curvas estándar de A β 40, la LLQ fue de 10 pg/ml y la LLD fue de 20 pg/g de tejido.

Ensayo Abeta40 de Plasma

Se recubrieron placas con anticuerpo TSD y se lavaron como para el ensayo de A β 40 de cerebro. Las muestras de plasma se diluyeron 1:3 en tampón de PBS, pH 7,8, nonidet P40 al 0,25%, BSA al 2,5%. Las muestras se cargaron en 6 replicados de 50 μ l por pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se detectaron usando 4G8-biotina (Signet) diluida 1:8000 en PBS, Tween al 0,05%, BSA al 0,1% durante 1 hora. Tres replicados tienen sólo el anticuerpo de 4G8-biotina y tres replicados tienen el anticuerpo de 4G8-biotina con A β 17-24 1 μ g/ml que compite con la señal específica y establece de este modo un valor de antecedente para cada muestra. Después de lavar como anteriormente, las placas se incubaron con estreptavidina-HRP (Zymed) diluida 1:50.000 en PBS, Tween al 0,05%, BSA al 0,1% durante 10 minutos. La detección y la cuantificación fueron como para ensayos de A β 40 de cerebro. Las muestras se normalizaron a una referencia de plasma situada en cada placa. En base a las curvas estándar de A β 40, la LLQ fue de 7,5 pg/ml y la LLD fue de 23 pg/gde plasma.

Ensayo Abeta40 de CSF

Se recubrieron placas con anticuerpo TSD y se lavaron como para el ensayo de A β 40 de cerebro. Las muestras de CSF se diluyeron 1:10 en PBS, pH 7,8, Tween-20 al 0,1%. Al tiempo de recogida, CSF se diluyó previamente 1:2 en BSA al 4% en agua. Las muestras se cargaron en 3 replicados de 50 μ l por pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se detectaron usando 4G8-biotina (Signet) diluida 1:8000 en PBS, Tween al 0,05%, BSA al 0,1% durante 1 hora. Debido a que el antecedente era bajo, no fue necesario cargar las muestras de forma replicada con un péptido que compita para este ensayo. Se detectó y cuantificó 4G8-HRP unido como para el ensayo de A β 40 de plasma. Las muestras se normalizaron a una referencia de CSF situada en cada placa. En base a las curvas estándar de A β 40, la LLQ fue de 20 pg/ml y la LLD fue de 400 pg/ml de CSF.

Ocupación de Sitio de Secretasa Gamma

Se cortaron secciones de cerebro en coronas a un grosor de 20 μ m en un criostato y se montaron descongeladas sobre portaobjetos Superfrost Plus. Las secciones se guardaron al nivel del hipocampo rostral, con 3 secciones por

portaobjetos a intervalos de aproximadamente 120 μm , y se congelaron a -20°C hasta usar. Para estudios de ocupación, las secciones de cerebro se calentaron a temperatura ambiente, se secaron, se incubaron durante 10 minutos en tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, después se transfirieron al mismo tampón conteniendo [^3H]IN973 1,5 nM (Goldstein, M.E. y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. (2007) 323:102-108) o [^3H](R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para definir unión no específica, las secciones adyacentes se incubaron en tampón conteniendo [^3H]IN973 o [^3H](R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida, pero incluyendo inhibidor de secretasa y no marcado a 0,5 μM . Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron tres veces durante 2 minutos cada uno en PBS enfriado en hielo, pH 7,2, sumergido en agua destilada enfriada en hielo, y secada con un ventilador que sopla aire frío. Los portaobjetos se situaron bajo pantallas de almacenamiento de fósforo sensibles a tritio (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) y se expusieron a la oscuridad durante 7 días. Se adquirieron imágenes de las pantallas de almacenamiento de fósforo usando un escáner de fósforo Cyclone (Packard, Meriden, CT) y adquisición de OptiQuant y software de análisis (Packard). Las densidades ópticas (expresadas como unidades de luz digitales por milímetro cuadrado) sobre áreas de interés se midieron y expresaron como un porcentaje de vehículo control.

Procedimientos de Histopatología

Tras eutanasia mediante asfixia con CO_2 , se eliminaron aproximadamente secciones de 3 cm de largo del duodeno proximal del abdomen, se aclararon con solución salina tamponada con fosfato enfriado en hielo y se situaron en formalina al 10% antes de seccionar. Las secciones de tejido del duodeno se embebieron en parafina líquida, se montaron sobre bloques, y se cortaron en secciones de anillo sagitales (luminales cruzadas) por triplicado y se tiñeron usando el procedimiento de base de Schiff de ácido peryódico antes de evaluación microscópica. Todos los animales sobrevivieron hasta que se llevó a cabo necropsia programada.

Estudios de Rata Agudos

Una dosis única de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida a 30 mg/kg redujo significativamente tanto A β 40 de plasma como A β 40 de cerebro a niveles del 2% al 16% del vehículo control, respectivamente. Para investigar adicionalmente el efecto de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en ratas, se administró una dosis única de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida a 1 mg/kg, 10 mg/kg, y 100 mg/kg y se recogieron tejidos después de medidas de ocupación de sitio a 2, 5, 8, 12, y 24 horas de A β 40 de plasma, A β 40 de cerebro y secretasa γ . Estas medidas mostraron que 10 mg/kg y 100 mg/kg redujeron el A β 40 de plasma y el A β 40 de cerebro a menos del 25% de los valores de A β 40 basales de 2 a 24 horas tras dosificar. En contraste, 1 mg/kg no causó un cambio estadísticamente significativo en A β 40 cerebral, pero en su lugar causó un aumento transitorio en A β 40 plasmático. En particular, A β 40 plasmático se incrementó a 250% de los valores de partida en 8 horas antes de volver a los valores basales en 24 horas. La ocupación de sitio de la secretasa γ y mostró que más del 94% de los sitios de unión del inhibidor de la secretasa y en el cerebro estaban ocupados a lo largo de todo el intervalo de dosificación tras la dosis de 100 mg/kg y en todo menos el punto temporal de 24 horas (88%) tras la dosis de 10 mg/kg. En contraste, sólo el 75% de los sitios de unión de la secretasa γ y de cerebro estaban ocupados 2 horas después de la dosis de 1 mg/kg y la ocupación de sitio volvió gradualmente a valores basales en 24 horas.

Los resultados de estudios de rata agudos mostraron que (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida redujo A β 40 de plasma, A β 40 de cerebro, y A β 40 de CSF con una DE_{50} entre 1 mg/kg y 10 mg/kg.

Estudios de Rata Subcrónicos

En base a los efectos de (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en A β 40 de cerebro de rata descritos en la sección previa, las ratas se administraron con dosis diarias de 3, 10, 30 ó 100 mg/kg/día. Los animales se sometieron a eutanasia 12 ó 24 horas después de la tercera dosis o 5 horas después de la cuarta dosis. Las reducciones de área bajo la curva de A β 40 cerebral se estimaron mediante extrapolación lineal de valores obtenidos de animales después de 5, 12, ó 24 horas de dosificación con el mismo grupo de dosis como se muestra en la Tabla 2. En base a estos análisis, las reducciones de área bajo la curva de A β 40 promediaron al 53% a 3 mg/kg/día y se incrementaron a más del 85% a dosis de 10 mg/kg/día o mayor. Los niveles de compuestos se midieron a diversos tiempos para estimar el área bajo la curva del compuesto (0-24 horas) en el comienzo y en el final del experimento. Estos valores mostraron que las exposiciones a compuesto después de 3 dosis estaban dentro de 2 veces de exposiciones después de la dosis inicial. La evaluación histológica del tejido duodenal de estas ratas mostró que 1/3 de las ratas dosificadas con 100 mg/kg/día tuvieron lesiones leves.

Tabla 2: Resumen de resultados a partir de estudios de rata de 4 días

Estudio	Dosis (mg/kg/día)	Área bajo la curva del compuesto PK (uM·h) (ng·h/ml)·plasma		Abeta 40 de terminal (% veh) ^a cerebro			Cerebro ^b % reducción del área bajo la curva de Aβ	Toxicidad GI
		Día 1 ^c	Final ^d	5h	12h	24h		
N°1 (N=3)	3	10	12	39%	35%	92%	49%	NAD
		5200	6240					
	10	48	12%	9%	28%	85%	NAD	
	30	169	93	8%	9%	13%	90%	NAD
		87880	48360					
N°2 (N=3)	3	10	13	16%	34%	94%	57%	NAD
		5200	3670					
	10	55	6%	4%	23%	91%	NAD	
	30	116	6%	4%	15%	93%	NAD	
	100	328	199	3%	3%	7%	96%	+ ^e
		170560	103480					

^a Los valores representan niveles de Aβ40 cerebral promedio para n = 3 animales expresados en relación al promedio del grupo control del vehículo

5 ^b Las reducciones de área bajo la curva de Aβ40 cerebral se estimaron mediante extrapolación lineal de valores obtenidos a partir de animales después de 5, 12 ó 24 h de dosificación con el mismo grupo de dosis .

^c Los valores representan área bajo la curva promedio (uM·h o ng·h/ml) a partir de n = 3 animales. Las áreas bajo la curva se estimaron a partir de muestras tomadas a 5, 12, y 24 h tras la dosis 1 (Estudio N°.: 1) o a partir de muestras tomadas a 5, 12, 17, y 24 h tras la dosis 1 (Estudio N°.: 2)

10 ^d Los valores representan área bajo la curva promedio (uM·h o ng·h/ml) a partir de n = 3 animales. Las áreas bajo la curva se estimaron a partir de muestras tomadas a 12 y 24 h tras la dosis 3 y 5 horas tras la dosis 4 (Estudio N°.: 1) o a partir de muestras tomadas a 12 y 17 tras las dosis 3 y 5 y 24 horas tras la dosis 4 (Estudio N°.: 2)

^e La metaplasia de células caliciformes se observó en 1 de 3 animales.

NAD = no se detectó ninguna anomalía

15 Los resultados de estudios de ratas subcrónicos mostraron que la (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida redujo Aβ40 cerebral sin toxicidad gastrointestinal. En particular, una dosis de 3 mg/kg/día causó una reducción de área bajo la curva de Aβ40 cerebral de aproximadamente el 50% comparada con una dosis de 100 mg/kg/día necesaria para inducir toxicidad gastrointestinal.

20 La evaluación microscópica del duodeno proximal en un animal individual en el grupo de dosis altas (1 de 3 animales se evaluaron a este nivel de dosis) dados 100 mg/kg/día de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida una vez diariamente durante 4 días reveló una metaplasia de células caliciformes leve en ese animal. No se notaron ningún cambio duodenal relacionado con fármacos en ratas dada (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida a ≤ 30 mg/kg.

25 En otro experimento, las ratas se dosificaron diariamente durante bien 4 o bien 7 días con 30 mg/kg/día o 300 mg/kg/día (Tabla 3). Los niveles de Aβ40 cerebrales en terminación (5 horas tras dosis) fueron el 13% del vehículo control y así similares a estudios de rata previos con (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida. Los niveles plasmáticos de compuestos fueron similares 5 horas después de la primera y la cuarta dosis. Algunas ratas en el grupo de dosis de 300 mg/kg/día (4 de 5) mostraron toxicidad gastrointestinal después de 4 días de dosificación, pero ninguna de las ratas en los otros grupos de
30 tratamiento tenía toxicidad gastrointestinal detectable, incluyendo animales administrados durante 7 días.

Tabla 3: Resumen de Resultados a partir de Estudio de Ratas N°: 3

Dosis ^a (mg/kg/día)	Conc. en plasma 5h post dosis (uM)		Día 4 Toxicidad GI	Conc. en plasma 5h post dosis (uM)		Día 7		
	Día 1 ^c	Día 4		Día 1	Día 7	Aβ40 cerebral (%veh)	5h	Tox GI
30	5,9	5,6	NAD	7,2	6,2	13%		NAD
300	12	10	+ ^b	14	11	13%		NAD

^a Se probaron n = 5 animales/grupo de dosis/punto temporal terminal (Día 4 o Día 7)

^b La metaplasia de células calciformes se observó en 4 de 5 animales.

NAD = no se detectó ninguna anomalía

5 Los resultados anteriores confirman que la (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida es un inhibidor de secretasa γ potente y selectivo. Estos resultados respaldan el uso de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida como un tratamiento terapéutico para enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades asociadas con péptido amiloide β .

10 Los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración y no están para interpretarse como que limitan la invención en cualquier manera en la medida en que son posibles variaciones de la invención dentro del espíritu de la invención.

15 Los compuestos de la presente solicitud se pueden preparar por una serie de rutas diferentes bien conocidas para alguien experto en la técnica de síntesis orgánica. Los compuestos de la presente solicitud se pueden sintetizar usando los procedimientos descritos más adelante, conjuntamente con procedimientos de síntesis en la técnica de química orgánica sintética, o variaciones en ella según se aprecian por los expertos en la técnica. Los procedimientos preferidos incluyen, pero no se limitan a, los descritos más adelante. Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por la presente en su totalidad en el presente documento mediante referencia.

20 Los compuestos se pueden preparar usando las reacciones y técnicas descritas en esta sección. Las reacciones se llevan a cabo en disolventes apropiados para los reactivos y materiales empleados y son adecuados para las transformaciones que se llevan a cabo. Además, en la descripción de los procedimientos de síntesis descritos más adelante, se entiende que todas las condiciones de reacción propuestas, incluyendo la elección de disolvente, temperatura de reacción, duración del experimento y procedimientos de estimulación, se eligen para ser las condiciones estándar para esa reacción, que se reconocerían fácilmente por cualquier experto en la técnica. Se entiende por alguien experto en la técnica de síntesis orgánica que la funcionalidad presente en diversas partes de la molécula debe ser compatible con los reactivos y reacciones propuestos. Tales restricciones a los sustituyentes que
25 son compatibles con las condiciones de reacción serán fácilmente patentes para alguien experto en la técnica y se deben usar después procedimientos alternativos.

Descripción de las realizaciones específicas

30 En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas se dan en grados centígrados. Los puntos de fusión se registraron en un aparato de punto de fusión capilar Thomas Scientific Unimelt y no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética de protones (RMN ¹H) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 300, un espectrómetro Bruker Avance 400, o un espectrómetro Bruker Avance 500. Todos los espectros se determinaron en los disolventes indicados y los cambios químicos se comunicaron en unidades δ más adelante del patrón interno tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento de interprotones se comunican en Hertz (Hz). Los patrones de multiplicidad se designan como sigue: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; m, multiplete; a, pico ancho; dd, doblete de dobletes; da, doblete ancho; dt, doblete de tripletes; sa, singlete ancho; dc, doblete de cuadruplete. Se determinaron los espectros de infrarrojos (IR) usando película de bromuro de potasio (KBr) o de cloruro de sodio en un espectrómetro Jasco FT/IR-410 o un Perkin Elmer 2000 FT-IR de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , calibrado a absorción de 1601 cm^{-1} de una película de poliestireno y se comunicaron en centímetros recíprocos (cm^{-1}). Se determinaron rotaciones ópticas $[\alpha]_D$ en un polarímetro Rudolph Scientific Autopol IV en los disolventes indicados; las concentraciones se dieron en mg/ml. Los espectros de masas (EM) de resolución baja y el peso molecular aparente (MH⁺) o (M-H)⁺ se determinó en un Finnegan SSQ7000. Los espectros de masas de resolución alta se determinaron en un Finnegan MAT900. La cromatografía líquida (CL)/espectro de masas se llevó a cabo en un Shimadzu LC acoplado a un Water Micromass ZQ.

45 Se usan las siguientes abreviaturas: DMF (dimetilformamida); THF (tetrahidrofurano); DMSO (dimetilsulfóxido), Leu (leucina); TFA (ácido trifluoroacético); MTBE (éter metiltercibutílico); DAST [trifluoruro de (dietilamino)azufre], HPLC (cromatografía líquida de alta presión); t.a. (temperatura ambiente); aq. (acuoso); PA (porcentaje de área).

Preparación A

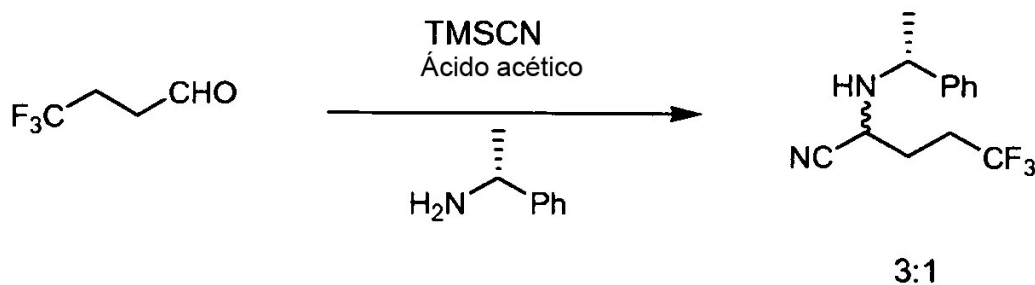
Clorhidrato de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapa A. 4.4.4-Trifluorobutanol



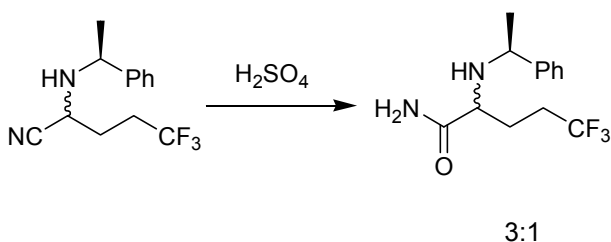
Se cargó diclorometano (4,2 l) dentro de un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 20 litros, equipado con agitación mecánica y baño de enfriamiento. La agitación se comenzó y la mezcla de reacción se enfrió a 0 a -2°C. Se cargó 4, 4, 4-trifluorobutanol (750,0 g) y la mezcla de reacción se enfrió adicionalmente a -5 a -8°C. Se añadió TEMPO; (2, 2, 6, 6-tetrametil-1- piperidiniloxi, radical libre) (9,15 g) manteniendo mientras la temperatura entre -5 a -8°C. Se añadió una solución de bromuro de potasio (60 g en 1,17 l de agua) a la solución anterior y la temperatura se mantuvo a -5 a -8°C. Una solución acuosa de NaOCl (8,8 l, 6-7% en peso, tamponada a pH = 8,5 usando bicarbonato de sodio) se añadió a la mezcla de reacción (advertencia: exotérmico) manteniendo mientras la temperatura de la mezcla de reacción a -5°C. De forma similar, el peryodato de sodio (NaIO₄) puede sustituirse por NaOCl como el agente oxidante. Después de adición completa, la fase de diclorometano se separó y la fase acuosa se lavó con diclorometano (1 x 750 ml). Las fases de diclorometano se combinaron y secaron usando sulfato de sodio anhidro. El agente secante se filtró, y la concentración de la solución de 4,4,4-trifluorobutanal se determinó mediante RMN. La solución que contiene el compuesto del título se usó directamente en la siguiente etapa sin procesamiento adicional. RMN ¹H (CDCl₃) (400 MHz) δ 2,30–2,50 (m, 2H, CH₂-CF₃), 2,70–2,80 (m, 2H, CH₂-CHO), 9,8 (s, 1H, CHO).

Etapa B. 5,5,5-Trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanonitrilo (mezcla de diastereómeros)



Se cargó R-α-metilbencilamina (528,5 g) dentro de un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica, baño de enfriamiento y mantenido bajo una capa de nitrógeno. Se cargó solución de 4,4,4-trifluorobutiraldehído (a partir de la Etapa A, 550 g), seguido por metanol (3,3 l). La mezcla de reacción se enfrió después a aproximadamente 0 a -3°C. El ácido acético (glacial, 260 ml) se añadió gota a gota, manteniendo la temperatura alrededor de 0°C seguido por cianuro de trimetilsililo (581 ml) durante un periodo de 15 minutos. De forma similar, el cianuro de sodio (NaCN) o el cianuro de potasio se podrían usar como la fuente de cianuro. La mezcla de reacción se calentó a 25 a 27°C y se agitó durante toda una noche. La finalización de la reacción se determinó mediante TLC. Se cargó agua helada (10,0 l) en la mezcla de reacción y la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (1 x 10,0 l). La fase de diclorometano se lavó con agua (2 x 10,0 l) seguida por salmuera (1 x 5,0 l). La fase de diclorometano se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida proporcionando el aminonitrilo del título (mezcla de diastereómeros) como un líquido viscoso, 90% de rendimiento promedio. RMN ¹H (CDCl₃) (400 MHz) δ 1,42 (d y m, 5H), 2,15 y 2,35 (dos m, 1H cada uno), 3,10–3,20 (m, 1H), 4,10–4,15 (m, 1H), 7,10–7,35 (m, 6H).

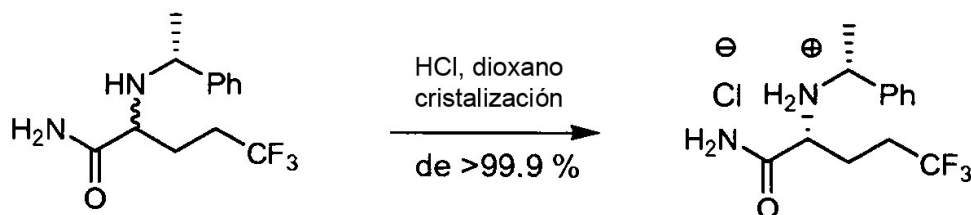
Etapa C. 5,5,5-Trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanamida (mezcla de diastereómeros)



Se disolvió 5,5,5-trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanonitrilo (mezcla en bruto de diastereoisómeros de Etapa B, 1,10 kg) en diclorometano (5,5 l) en un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica, baño de hielo para enfriar y se mantuvo bajo una capa de nitrógeno. La agitación se comenzó y la mezcla de reacción se enfrió a 0 a -5°C. Se añadió gota a gota ácido sulfúrico concentrado (1,75 l) durante un periodo de 1 hora dentro de la mezcla anterior, manteniendo la temperatura por debajo de 0°C; se obtuvo una solución transparente después de que se completó la reacción. La temperatura de la mezcla de reacción se elevó a 25 a 27°C y se agitó durante toda una noche (12-14 h).

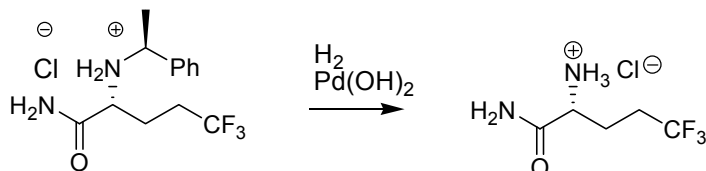
La finalización de la reacción se determinó mediante HPLC. La mezcla de reacción se vertió lentamente sobre hielo picado (~ 15,0 kg) y se neutralizó con amoníaco acuoso (~25% en volumen). La fase acuosa se separó y se extrajo con diclorometano (2 x 3,0 l). La fase de diclorometano combinada se lavó con agua (1 x 12,0 l) seguida por salmuera (1 x 3,0 l). La fase orgánica rica en producto se secó sobre sulfato de sodio acuoso y se concentró bajo presión reducida proporcionando 0,85 kg (72,0%) del compuesto del título en bruto. RMN ¹H (CDCl₃) (400 MHz) (mezcla de diastereómeros) δ 1,36 (d y m, 4H, CH₃ (J = 8,0 Hz y 1H de CH₂), 1,90 (m, 1H de CH₂), 2,15 y 2,35 (dos m, 1H cada uno de CH₂-CF₃), 2,80–2,90 (m, 1H, CH-fenilo), 3,60–3,70 (m, 1H, -(CONH₂)CH(NH)), 5,90 y 6,45 (1H cada una de CONH₂ con picos menores para otro diastereómero), 7,20–7,40 (m, 6H, Ar + NH).

Etapa D. Clorhidrato de (R)-5,5,5-trifluoro-2-((R)-1-feniletilamino)pentanamida



Se cargó 5,5,5-trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanamida (mezcla de diastereómeros) (850 g) dentro de un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica y baño de enfriamiento. Se cargaron metanol (2,55 l), acetato de etilo (1,7 l) y agua (1,06 l) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 a 5°C. Se añadió gota a gota una solución de HCl en dioxano (4,5 M, 1,72 l) durante un periodo de 30 a 45 minutos. De forma similar, podrían usarse mezclas de isopropanol y éter metiltercbutílico como disolvente y HCl acuoso o concentrado podría usarse como la fuente de HCl. La temperatura de la mezcla de reacción se elevó después a 25 a 27°C y se agitó durante 2 horas. La finalización de la reacción se determinó mediante TLC. El sólido que precipitó se filtró y la torta se lavó con un disolvente adecuado, tal como acetato de etilo (1,8 l) seguido por éter de petróleo (2,5 l) o una mezcla de isopropanol y éter metiltercbutílico. El sólido se dejó secar a temperatura ambiente en una bandeja abierta, dando la amida de R-amino del título (480 g, rendimiento del 50%, exceso diastereomérico = 99,9%) RMN ¹H (CDCl₃) (400 MHz) δ 1,73 (d, 3H, CH₃, J = 8,0 Hz), 2,08–2,09 (m, 2H de CH₂), 2,20–2,40 (m, 2H, CH₂-CF₃), 3,50–3,55 (m, 1H, CH-fenilo), 4,40–4,41 (m, 1H, -(CONH₂)CH(NH)), 7,48–7,53 (sa, 5H, Ar).

Etapa E. Clorhidrato de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida



A un recipiente a presión adecuado, se cargó clorhidrato de (R)-5,5,5-trifluoro-2-((R)-1-feniletilamino)-pentanamida (1,50 kg) junto con metanol (15,0 l). Esto se siguió por la adición de agua (701,0 ml) seguida por hidróxido de paladio al 20% en carbono (225 g). De forma similar, se podría usar paladio en carbono (Pd/C) como el catalizador de hidrogenación. El recipiente se purgó con nitrógeno tres veces, y después el gas de hidrógeno se presurizó dentro del recipiente (3-4 kg/cm²) a 60°C. La reacción se siguió para finalización mediante HPLC. Tras la finalización, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 30-35°C y se filtró a través de un lecho de Celite, después se lavó con metanol. El filtrado se concentró después bajo presión reducida. Después de concentración completa, la mezcla de reacción restante se trató con diclorometano (2,5 l por lavado), se filtró y se secó a vacío a 45°C durante 12 horas, dando el compuesto del título (915 g, 91,0%; Pureza = 97%). RNM ¹H (DMSO-d₆) (400 MHz) δ 2,00 (m, 2H, CH₂), 2,30–2,40 (m, 2H de CH₂-CF₃), 3,85–3,88 (m, 1H, -(CONH₂)CH(NH)), 7,64 y 8,11 (sa, 1H, cada uno de CONH₂), 8,44 (sa, 3H, NH₃⁺). RMN ¹³C (DMSO-d₆) (100,0 MHz) δ 169,57, 131,20, 128,45, 125,71, 122,97, 50,91, 29,46, 29,18, 28,89, 28,61, 23,56, 23,53.

Preparación B

(R)-5,5,5-Trifluoronorvalina

Procedimiento A. R-transaminasa (transaminasas de Biocatalytics y de BMS)

Una solución que contenía ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (100 mg, 0,588 mmol), R,S-alanina (200 mg, 2,244 mmol), y fosfato de piridoxal 0,02 mM, en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,5, se incubó con enzima R-transaminasa AT-103 de Biocatalytics (5 mg, 44 unidades) o R-transaminasa clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* SC16569 (0,5 ml, 10 unidades, transaminasa BMS) a 30°C en un volumen total de 5 ml en tubos de 15 ml durante 44 horas. Se obtuvieron rendimientos de reacción de ácido (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanoico del 49% y del 48% con transaminasas AT-103 y de BMS, respectivamente. E.e. fue el 100% en ambos casos.

Los rendimientos se incrementaron añadiendo enzimas auxiliares para reducir piruvato a lactato. La lactato deshidrogenasa requiere NADH como un cofactor. El NADH se regeneró usando formiato deshidrogenasa. Una

solución que contiene ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (100 mg, 0,588 mmol), D,L-alanina (200 mg, 2,244 mmol), fosfato de piridoxal 0,02 mM, formiato de sodio (68 mg, 1 mmol), NAD (3,31 mg, 5 μ moles) L-lactato deshidrogenasa clonada a partir de músculo de conejo (Biocatalytics LDH-103, 0,107 mg, 15 unidades), y formiato deshidrogenasa (0,5 ml, 15 unidades clonadas a partir de *Pichia pastoris* y expresadas en *Escherichia coli*) en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, se incubó con R-transaminasa AT-103 a partir de Biocatalytics (5 mg, 44 unidades) o R-transaminasa clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* SC16569 (0,5 ml, 10 unidades) a 30°C en un volumen total de 5 ml en tubos de 15 ml. Se obtuvieron rendimientos de reacción de ácido (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico del 94% y del 91% con transaminasas AT-103 y de BMS, respectivamente. E.e. fue del 100% en ambos casos.

10 **Procedimiento B. (R)-Aminoácido deshidrogenasa (de Biocatalytics y de BMS)**

Procedimiento 1: se cargaron ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (500 mg, 2,94 moles), NH₄Cl (64,19 mg, 1,2 moles), glucosa (86,4 mg, 0,479 moles), y agua (975 ml) a un reactor con camisa de 2 l. Se añadió NaOH (36 ml de 10 N) y la mezcla se agitó con un imán a 30°C disolviendo los sólidos. El pH era aproximadamente 7. Se añadió Na₂CO₃ (12,72 g, 0,12 moles) que lleva el pH a aproximadamente 8,5. Se añadieron después en ese orden NADP (458 mg, 0,60 mmoles), glucosa deshidrogenasa (33,7 mg, 5277 unidades de Amano Enzyme Company) y R-aminoácido deshidrogenasa (600 mg de D-AADH-102, de Biocatalytics). La mezcla de reacción se llevó a pH 9 mediante adición gota a gota de NaOH 10 N. La mezcla de reacción se agitó a 30°C y se mantuvo a pH 9,00 mediante adición de NaOH 5 N desde un pH establecido. Después de 21 horas el rendimiento de la solución de (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico fue 51,1 g, rendimiento del 84,7%, e.e. del 100%.

Procedimiento 2: se cargaron ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (60,00 mg, 0,353 moles), NH₄Cl (64,19 mg, 1,2 moles), glucosa (86,4 mg, 0,479 moles), y agua (975 ml) a un reactor con camisa de 2 l. Se añadió NaOH (36 ml de 10 N) y la mezcla se agitó con un imán a 30°C disolviendo los sólidos. El pH era aproximadamente 7. Se añadió Na₂CO₃ (12,72 g, 0,12 moles) que lleva el pH a aproximadamente 8,5. Se añadieron después en ese orden NADP (458 mg, 0,60 mmoles), glucosa deshidrogenasa (33,7 mg, 5277 unidades de Amano Enzyme Company) y D-aminoácido deshidrogenasa (50 ml de extracto conteniendo 1500 unidades, enzima de BMS). La mezcla de reacción se llevó a pH 9 mediante adición gota a gota de NaOH 10 N. La mezcla de reacción se agitó a 30°C y se mantuvo a pH 9,00 mediante adición de NaOH 5 N desde un pH establecido. Después de 15 horas el rendimiento de la solución de (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico fue 51,04 g, rendimiento del 84,6%, e.e. del 99,1%.

Preparación C

30 **4-(Bromometil)-3-fluorobenzonitrilo**



Procedimiento A. Bromación con NBS/AIBN

Se cargó 1,2-dicloroetano (151 kg) a un reactor de 200 l junto con 4-ciano-2-fluorotolueno (24 kg) y AIBN (2 kg). La mezcla se calentó a 70~74°C. Una vez la temperatura del lote alcanzó 70°C, se añadió N-bromosuccinimida (47,4 kg) por partes a la velocidad de 12 kg/h, manteniendo la temperatura a 70~74°C (es importante controlar la velocidad de reacción para evitar reacción exotérmica). La mezcla se muestreó por medio de detección de CG después de que se añadieron 24 kg de N-bromosuccinimida, y la reacción se calentó a 70-74°C hasta que se observó la reacción completa. La mezcla se enfrió a 0-5°C y se dejó reposar durante 2 horas adicionales. La mezcla se filtró, y la torta se lavó con MTBE (24 kg). El filtrado se lavó con agua (3 x 65 kg). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio (10,3 kg) durante 6 horas, se filtró y la torta se lavó con MTBE (24 kg). La solución se evaporó bajo presión reducida, y se añadió etanol (12 kg) y la mezcla se calentó a 40-45°C, después se enfrió lentamente a 0-5°C agitando mientras hasta cristalizar. La mezcla se filtró y la torta se lavó con etanol frío (5 kg). El sólido en bruto se recristalizó en éter de petróleo, se filtró y se lavó con éter de petróleo (10 kg), dando el compuesto del título 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo como un sólido blanquecino (21 kg, rendimiento del 55%). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 4,46-4,50 (m, 2 H) 7,36 (dd, J = 8,85, 1,32 Hz, 1H) 7,44 (dd, J = 7,91, 1,32 Hz, 1H) 7,52 (dd, J = 7,91, 7,16 Hz, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ ppm 23,65 (d, J = 4,60 Hz, 1C) 113,76 (d, J = 9,77 Hz, 1C) 117,09 (d, J = 2,87 Hz, 1C) 119,44 (d, J = 24,71 Hz, 1C) 128,44 (d, J = 4,02 Hz, 1C) 130,66-130,81 (s, 1C) 130,81-131,06 (s, 1C) 132,18 (d, J = 3,45 Hz, 1C) 159,86 (d, J = 254,03 Hz, 1C). IR: (KBr) 3088, 3077, 3040, 2982, 2250, 1571, 1508, 1439, 1248 cm⁻¹.

Análisis calculado para C₈H₅BrFN: Calc: C, 44,89; H, 2,35; N, 6,54; F, 8,88; Hallado: C, 44,94; H, 2,73; N, 6,56; F, 8,73

Procedimiento B. Bromación con bromato de sodio

A un reactor adecuado de 200 l se añadió diclorometano (40 l) y 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo (4 kg, 18,7 mol) seguido por una solución de bromato de sodio en agua (13,45 kg, 89,1 mol disuelta en 53,6 l de agua). La mezcla de reacción se enfrió a 0-5°C. Se añadió una solución de bisulfuro de sodio (9,25 kg disueltos en 42 l de agua) durante

un periodo de 2-3 horas manteniendo mientras una temperatura de lote de 10-20°C (la reacción es exotérmica). Después de que la adición se completó, una lámpara de 200 W se proyectó en el reactor y la temperatura del lote se incrementó a 25-30°C. La luz y la temperatura se continuaron hasta que el producto fue 70-75% mediante HPLC. La luz se retiró, la agitación se detuvo y la reacción se dejó asentarse durante 15 minutos. La fase orgánica se retiró y la fase acuosa restante se extrajo con diclorometano dos veces. Las fases orgánicas se combinaron y lavaron cuatro veces con solución de tiosulfato de sodio al 10%. La fase orgánica se lavó después con salmuera (10 l) y se secó sobre sulfato sódico. La fase orgánica se concentró y después se añadió éter de petróleo y se destiló hasta sequedad dos veces para eliminar todo el diclorometano. Se añadió éter de petróleo (3 l) y la suspensión se enfrió a 5-10°C durante 1 hora. La suspensión se filtró y se lavó con éter de petróleo frío. El producto se secó en un horno a vacío a 40-45°C dando el compuesto del título (3,2 kg, rendimiento al 50,4%) como un sólido blanquecino.

Procedimiento representativo para recuperación del compuesto del título a partir de las aguas madres: La masa en bruto (~36% 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo y ~59% gem-dibromuro) obtenida a partir de concentración de aguas madres (300 g) y dos equivalentes de diisopropiletilamina (basada en gem-dibromuro) se disolvió en acetonitrilo (3 l) y agua (50 ml). La reacción se enfrió a 0-5°C y se añadió fosfito de dietilo (169 g, 1,22 mol) durante 30 minutos (la adición fue exotérmica). La reacción se agitó durante 60-90 minutos a 0-5°C y se siguió mediante TLC. Cuando ya no había dibromuro presente mediante TLC, se añadió agua (3,3 l) y la suspensión resultante se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó en un horno a vacío (hasta que el contenido de humedad fue <1%) dando 202 g (98 PA mediante HPLC) de compuesto del título adicional.

Preparación D

Preparación de 3-fluoro-N'-hidroxi-4-metilbencimidamida

A un recipiente adecuado equipado con agitador mecánico bajo atmósfera de N₂ se cargaron 202,0 g de 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo seguidos por 1,0 l de etanol. Se añadió hidroxilamina (144 ml de solución al 50% en agua) por medio de embudo de adición durante 20 minutos. La mezcla se agitó durante toda una noche a temperatura ambiente. El análisis de HPLC mostró que la relación estaba completa (no quedaba nada del material de partida). Se añadió agua (3,0 l) gota a gota a la solución amarillo pálido durante 1 hora dando una suspensión espesa. La suspensión se enfrió en un baño de hielo a 2°C durante 1,5 horas, se filtró y se secó a vacío a 35°C durante 22 horas dando el compuesto del título (230,3 g, 91,6%) como un sólido blanco. RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,30 (m, 2H), 7,19 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 2,28 (s, 3H); RMN-¹³C (CDCl₃, 500 MHz) δ 162,15, 160,19, 151,58, 131,82, 131,76, 131,66, 131,62, 127,01, 126,87, 121,06, 112,69, 112,51, 14,48; RMN-¹⁹F (CDCl₃, 500 MHz) δ -116,35, -116,37, -116,39. CL-EM M+H 169,19

Preparación E

Preparación de 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol

Procedimiento A. Trifluoruro de boro

Se suspendieron amida oxima en bruto 3-fluoro-N'-hidroxi-4-metilbenzimidamida (118,6 g) y ortoformiato de trietilo (292 ml, 260 g, 1,76 mol) en diclorometano (800 ml) y se añadió trifluoruro de boro eterato de dietilo (14,8 ml, 16,6 g, 0,12 mol) a temperatura ambiente. La solución amarilla resultante se calentó a 45°C durante 1 hora y se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas, lo que proporciona una conversión del 60% mediante HPLC. La solución se calentó a 45°C durante 2,5 horas que llevaron a la conversión al ~ 1% de material de partida residual. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió a la mezcla HCl 1N (600 ml). Las fases se separaron, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (200 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a 25°C bajo presión reducida proporcionando un sólido blanco. Secar bajo alto vacío durante 16 horas proporcionó el compuesto del título (102,3 g, rendimiento del 98% durante dos etapas).

Procedimiento B. Ácido trifluoroacético

Un recipiente adecuado equipado con un agitador mecánico bajo una atmósfera de N₂ se cargó con 3-fluoro-N'-hidroxi-4-metilbenzimidamida (302,52 g, 1,79 mol), ortoformiato de trietilo (382,5 ml, 341,1 g, 2,3 mol) y acetonitrilo (1512 ml). La mezcla de reacción se calentó a 45°C y se añadió ácido trifluoroacético (6,72 ml, 10,08 g, 87,6 mmol) a esta temperatura. La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante unos 90 minutos adicionales, después se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua (3 l) gota a gota durante un periodo de 60 minutos. La suspensión se enfrió a 4°C y se agitó a esta temperatura durante 30 minutos. El sólido se filtró y se secó en el vacío a 50°C durante 12 horas dando 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol como un sólido blanco (306 g, 95,6%). HPLC indicó pureza química al 99,8%. RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,67 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,23 (t, J = 8 Hz, 1H), 2,28 (s, 3H); RMN-¹³C (CDCl₃, 400 MHz) δ 166,9447, 164,7258, 162,5473, 160,1066, 132,0480, 132,0077, 128,5987, 122,9910, 122,9507, 114,2568, 114,0147, 14,6902. RMN-¹⁹F (CDCl₃, 400 MHz) δ -115,94, -115,96.

Análisis Calculado. para C₉H₇N₂O: C, 60,67; H, 3,96; N, 15,72. Hallado: C, 60,54; H, 3,78; N, 15,69

Preparación F

Preparación de 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol

Procedimiento A. Bromación etapa a etapa

A una mezcla en agitación de 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (5,34 g, 30 mmol), CCl₄ (50 ml) y NBS (11,7 g, 66 mmol) se añadió AIBN (246 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 3 horas bajo nitrógeno, se enfrió a temperatura ambiente, y se añadieron 50 ml de solución de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se separó y la fase acuosa restante se extrajo con diclorometano (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un rotoevaporador dando 3-(4-(dibromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-

oxadiazol, (9,34 g, 93%) como un sólido blanco que se usa en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se cargó un matraz de fondo redondo de 200 ml con 3-(4-(dibromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (8,37 g, 25 mmol) y THF (60 ml). La mezcla se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota diisopropiletilamina (3,48 g, 27 mmol) durante 15 minutos, seguido por fosfito de dietilo (3,7 g, 26,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se desactivó con 40 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 80 ml). La fase orgánica combinada se lavó con 20 ml de NH₄Cl saturado acuoso y 20 ml de solución de cloruro de sodio saturada. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró en un rotoevaporador dando un sólido en bruto que se purificó mediante una almohadilla de sílice proporcionando 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (6,03 g, 94%). P.f.: 87,3°C. RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,80 (s, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,87 (dd, 1H), 7,58 (t, 1H), 4,57 (s, 2H); RMN-¹³C (CDCl₃, 400 MHz) δ 166,97, 166,95, 165,45, 162,29, 159,73, 132,34, 132,30, 128,99, 128,90, 128,81, 124,04, 124,01, 115,56, 115,32, 25,22, 25,18; RMN-¹⁹F (CDCl₃, 400 MHz) δ -115,81, -115,84, -115,86. Análisis calculado. para C₉H₆BrFN₂O: C, 42,05; H, 2,35; N, 10,90. Hallado: C, 42,17; H, 2,17; N, 10,63.

Procedimiento B. Bromación alternativa en un solo recipiente

Se disolvieron 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (101,8 g, 0,57 mol) y N-bromosuccinimida (206 g, 1,16 mol) en acetonitrilo (~1 l) y se añadió azobisisobutironitrilo (4,2 g, 26 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se calentó a 70°C durante 2 horas punto en el que la HPLC mostró la conversión completa del material de partida a una mezcla del monobromuro y el dibromuro. La mezcla se enfrió a 0°C y se añadió diisopropiletilamina (73 ml, 54,2 g, 0,42 mol) manteniendo mientras la temperatura de reacción por debajo de 5°C. Se añadió lentamente fosfito de dietilo (54,7 ml, 58,6 g, 0,42 mol) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. Después de 2 horas la HPLC mostró conversión completa del dibromuro al monobromuro. Se añadió agua (1,2 l) y el precipitado resultante se filtró. Lavar con agua (2 x 200 ml) y secar proporcionó 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (135 g, rendimiento del 92%).

Procedimiento C: bromación con bromato de sodio (aislamiento directo)

Se disolvió bromato de sodio (2,54 g) en agua (8,4 ml). A esta solución se añadió una solución de 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (1,0 g) en EtOAc (12 ml) a t.a. Se añadió gota a gota una solución de NaHSO₃ (1,75 g) en agua (17 ml) (PRECAUCIÓN: EXOTÉRMICO). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h, y después se mantuvo en una cámara fría durante toda una noche. La fase orgánica se separó, se lavó con Na₂S₂O₃ al 10% y agua, y después se concentró. El sólido resultante se disolvió en EtOAc (~6 ml). Se añadió heptano lentamente (~30 ml). La suspensión se agitó a t.a. durante 3 h, y después se filtró. El sólido se lavó con heptano (15 ml), después se secó dando 0,74 g (51%) del compuesto del título: HPLC: 99,42 PA. Recuperación de segunda cosecha: el filtrado se concentró a un volumen de ~30 ml y la suspensión resultante se filtró dando el compuesto del título como un sólido blanco 0,23 (16%) con HPLC 97,09 PA.

Procedimiento D: bromación con bromato de sodio (procedimiento de dos etapas usando reducción de dibromuro)

Se añadió una solución de 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (20,0 g, 112,2 mmol) en diclorometano (200 ml) a una solución de NaBrO₃ (50,8 g, 336,7 mmol) en agua (200 ml) a t.a. La mezcla de dos fases resultante se enfrió a 0°C. La solución de NaHSO₃ (35,7 g, 336,7 mmol) en agua (160 ml) se añadió gota a gota manteniendo la temperatura del lote por debajo de 20°C (~1 h). La solución roja resultante se calentó a t.a. hasta que 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol estuvo por debajo de 1,0 PA mediante HPLC (~2 h). La fase orgánica (fase del fondo) se separó, y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (200 ml). La solución de diclorometano combinada se lavó con solución de Na₂S₂O₃ acuosa al 10% (200 ml), agua (200 ml) y salmuera al 15% (200 ml). Se obtuvo un sólido blanco (una mezcla de monobromuro y dibromuro) después de concentrar a vacío. Este sólido se disolvió en MeCN húmedo (200 ml, KF: 1,5-4%), y la solución se enfrió a -5°C a 0°C. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (6,0 g, 8,1 ml, 46,4 mmol) seguido por adición gota a gota de fosfito de dietilo (6,0 g, 46,1 mmol) durante 15 minutos. La mezcla se agitó a -5°C a 0°C hasta que 3-(4-(dibromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol fue <0,5 PA (1,5-2 h). Se añadió agua (500 ml) durante 30 minutos, dando como resultado una suspensión blanca. Esta suspensión se agitó a t.a. durante 1-3 h, y después se filtró. La torta se lavó con agua (2 X 200 ml), y después se secó a vacío a 45°C durante 20 h.

Análisis calculado. para C₉H₆BrFN₂O: Calc.: C, 42,05; H, 2,35; N, 10,89; Br, 31,08; F, 7,39. Hallado: C, 42,10; H, 2,24; N, 10,90; Br, 31,18; F, 7,00.

Ejemplo 1

(2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapas A. 5,5,5-Trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanonitrilo

A una solución de (R)-feniletilamina (9,60 g, 79,4 mmol) y ácido acético (5,08 g, 79,6 mmol) en MeOH (150 ml) se añadió NaCN (3,88 g, 79,6 mmol). La reacción se enfrió a 0°C y se añadió una solución de 4,4,4-trifluorobutiraldehído (10,0 g, 79,6 mmol) en MeOH (50 ml). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. La reacción se diluyó con agua (400 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 300 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío proporcionando el compuesto del título de aminonitrilo (18,1 g, 89%, como una mezcla 4:1 de diastereómeros) como un aceite amarillo pálido: RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 7,38–7,27 (m, 5H), 4,15–4,02 (m, 1H), 3,69 (t, J = 7,5 Hz, 0,22H), 3,18 (t, J = 7,5 Hz, 0,78H), 2,48–2,26 (m, 1H), 2,25–2,03 (m, 1H), 2,01–1,86 (m, 2H), 1,39 (d, J = 6,5 Hz, 2,34H), 1,36 (d, J = 6,5 Hz, 0,66H); ESI EM m/z 257 [C₁₃H₁₅F₃N₂ + H].

Etapas B. Clorhidrato de (R)-5,5,5-trifluoro-2-(R)-1-feniletilamino)pentanamida

A una solución de 5,5,5-trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanonitrilo (18,0 g, 70,31 mmol, mezcla 4:1 de diastereómeros) en CH₂Cl₂ (100 ml) se añadió H₂SO₄ (100 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante

22 h, se vertió sobre hielo picado y se neutralizó con NH_4OH . La mezcla se extrajo con EtOAc (3 × 500 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a vacío proporcionando la base libre del compuesto del título como una mezcla de diastereómeros (18,94 g, 98%) como un aceite naranja: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,40–7,18 (m, 5H), 6,78 (sa, 0,23H), 6,50 (sa, 0,77H), 6,00 (sa, 0,77H), 5,81 (sa, 0,23H), 3,82 (c, J = 6,5 Hz, 0,23H), 3,70 (c, J = 6,5 Hz, 0,77H), 3,14 (t, J = 6,0 Hz, 0,23H), 2,86 (t, J = 7,0 Hz, 0,77H), 2,35–1,86 (m, 2H), 1,84–1,64 (m, 2H), 1,39 (d, J = 6,5 Hz, 0,69H), 1,35 (d, J = 6,5 Hz, 2,31H); IE EM m/z 275 [$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O} + \text{H}$].

Sal Clorhidrato

A una solución de la base libre del compuesto del título como una mezcla de diastereoisómeros (11,9 g, 43,4 mmol) en $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (7:1, 40 ml) se añadió una solución de HCl 1N en Et_2O (70 ml). El precipitado blanco formado se redisolvió calentando la mezcla y añadiendo MeOH (a una razón final de $\text{Et}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 4:1). La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dejó reposar durante toda una noche. La sal clorhidrato de aminoamida del compuesto del título se aisló como un diastereómero individual (3,11 g, 23%) como un sólido blanco: RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 7,93 (sa, 1H), 7,69 (sa, 1H), 7,54–7,44 (m, 5H), 4,39 (c, J = 7,0 Hz, 1H), 3,50 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 2,29–2,20 (m, 2H), 2,10–2,01 (m, 2H), 2,07 (d, J = 7,0 Hz, 3H); IE EM m/z 275 [$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O} + \text{H}$].

Etapas C. (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida

A una solución de clorhidrato de (R)-5,5,5-trifluoro-2-((R)-1-feniletilamino)pentanamida (3,10 g, 10,0 mmol) en EtOH (100 ml) se añadió $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (350 mg) y agua (10 ml). La mezcla de reacción se hidrogenó (275800 pascales (40 psi)) durante 4 h a 50°C. La reacción se filtró a través de celite y el filtrado se concentró a vacío proporcionando el clorhidrato de amina intermedio como un sólido blanco. A una suspensión de la amina en CH_2Cl_2 (100 ml) se añadió N,N-diisopropiletilamina (5,25 ml, 30,0 mmol) y cloruro de 4-clorobencenosulfonilo (2,53 g, 12,0 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con NaHCO_3 (250 ml) y salmuera (250 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , y se concentró a vacío. El compuesto del título (2,91 g, 84%) se obtuvo como un sólido blanco mediante trituración del residuo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexanos}$ (2:1): RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 7,84 (dt, J = 8,5, 2,0 Hz, 2H), 7,55 (dt, J = 8,5, 2,0 Hz, 2H), 3,85 (dd, J = 8,5, 5,0 Hz, 1H), 2,34–2,05 (m, 2H), 1,97–1,68 (m, 2H); IE EM m/z 345 [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S} + \text{H}$].

Etapas D. (R)-2-(4-cloro-N-(2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)encil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida

A una solución de sulfonamida (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (130 mg, 0,37 mmol) en DMF (2 ml) se añadió Cs_2CO_3 (241 mg, 0,74 mmol) y 3-(4-bromometil-3-fluoro-bencil)-1,2,4-oxadiazol (257 mg, 0,48 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se diluyó con agua (50 ml), y se extrajo con EtOAc (2 × 50 ml). El extracto orgánico combinado se lavó con agua (2 × 50 ml) y salmuera (50 ml) y se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc 0-55%/hexanos) proporcionando el compuesto de oxadiazol del título (92 mg, 45%) como un sólido blanco: p.f.: 66–68°C; RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,77 (s, 1H), 7,90 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,77–7,71 (m, 3H), 7,64 (dd, J = 7,5, 7,5 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,34 (s, 1H), 5,28 (s, 1H), 4,66 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,39 (dd, J = 8,9, 6,3 Hz, 1H), 2,25–1,82 (m, 3H), 1,54–1,47 (m, 1H); IE EM m/z 521 [$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S} + \text{H}$]⁺; HPLC 98,9% (área bajo la curva), t_R = 19,4 min.

Ejemplo 2

(2R)-2-[[4-(4-clorofenil)sulfonil]][2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)encil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapas A. 4-(Bromometil)-3-fluorobenzonitrilo

A una solución de 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo (5,0 g, 0,23 mol) en 100 ml de tetracloruro de carbono se añadió N-bromosuccinimida (4,97 g, 0,28 mol) y AIBN (100 mg, 0,61 mmol) y la mezcla se sometió a reflujo durante seis horas. La reacción se enfrió y se filtró. El filtrado se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y los disolventes se eliminaron a vacío proporcionando 5,44 g del compuesto del título como un sólido blanquecino. RMN ^1H indicó la presencia de material de partida al 20%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) para el compuesto del título: δ 7,54–7,30 (m, 3H), 4,83 (s, 2H).

Etapas B. (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida

A una solución de (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (6,88 g, 20,0 mmol) y 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo (6,43 g, 30 mmol) en DMF (35 ml) se añadió Cs_2CO_3 anhidro (19,56 g, 60 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 45 min y después se diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con agua (100 ml X 4) y se secó sobre Na_2SO_4 . El producto se purificó mediante Biotage (columna 40+M, EtOAc del 3% al 80% en hexanos, 651 ml). El compuesto del título se obtuvo como un sólido blanco (6,50 g, rendimiento del 68,1%). RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 7,80–7,88 (m, 3H), 7,70–7,75 (m, 2H), 7,67 (d, 2H, J = 8), 7,60 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 4,99 (d, 1H, J = 16), 4,68 (d, 1H, J = 16), 4,14 (t, 1H, J = 8), 1,99–2,17 (m, 2H), 1,80–1,94 (m, 1H), 1,40–1,56 (m, 1H). CL/EM M+H 478,14, 94%.

Etapas C. (2R)-2-[[4-(4-clorofenil)sulfonil]][2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)encil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

A una solución de (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (6,5 g, 13,6 mmol) en EtOH (70 ml) se añadió NH_2OH (50% en H_2O , 2,6 g, 40,8 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80°C bajo nitrógeno durante 1 h y después se enfrió a t.a. Los disolventes se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua y se secó sobre Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente dio un sólido blanco que se recrystalizó en EtOAc y hexanos proporcionando la amida oxima intermedia como un sólido blanco (6,93 g, rendimiento cuantitativo). A una mezcla de la (R)-2-(4-cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxicarbamimidol)encil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida intermedia (6,93 g, 13,6 mmol) y

ortoformiato de trietilo (6,77 ml, 40,8 mmol) en dicloroetano (30 ml) se añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,17 ml, 1,36 mmol). La mezcla resultante se agitó a 70°C durante 1 h y después se enfrió a temperatura ambiente. La cromatografía (gel de sílice, biotage, columna 40+M, EtOAc al 3% a 80% en hexanos, 651 ml) proporcionó el compuesto del título como un sólido blanco. (4,9 g, rendimiento 69,3%).

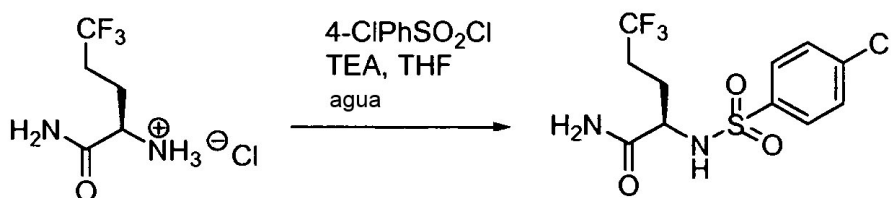
5 Los anteriores 4,9 g de producto se combinaron con un segundo lote de 9,8 g de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (preparada mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1). A los lotes combinados (14,7 g) se añadió alcohol isopropílico (75 ml). La mezcla se sometió a reflujo hasta disolución casi completa, y después se filtró. El filtrado se agitó a t.a. durante 16 horas y se filtró. Un sólido blanco cristalino fino blanco se obtuvo después de secar masa constante proporcionando hasta (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

10 (13,7 g). RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 8,77 (s, 1H), 7,90 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,77–7,71 (m, 3H), 7,64 (dd, J = 7,5, 7,5 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 6,34 (s, 1H), 5,28 (s, 1H), 4,66 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,51 (d, J = 15,6 Hz, 1H), 4,39 (dd, J = 8,9, 6,3 Hz, 1H), 2,25–1,82 (m, 3H), 1,54–1,47 (m, 1H); IE EM m/z 521 [$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S} + \text{H}^+$].

Ejemplo 3

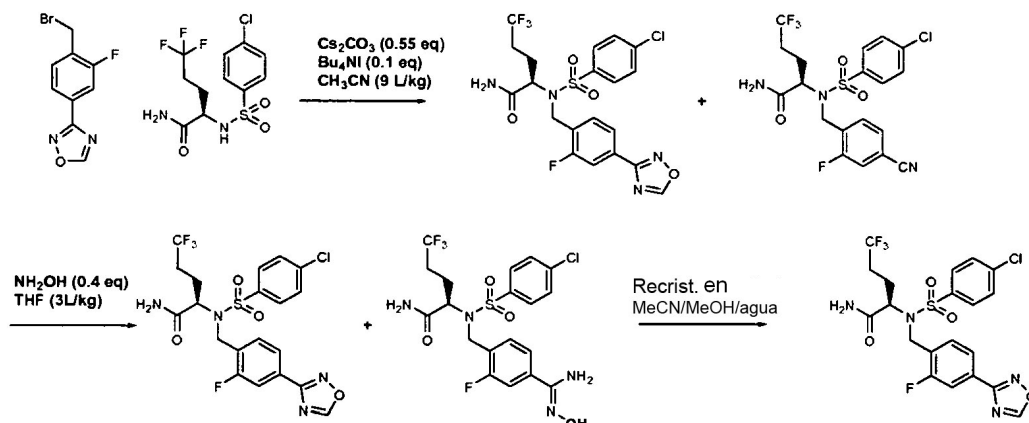
15 **(2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida**

Etapa A. (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida



A un recipiente seco adecuado se añadió clorhidrato de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida (199,52 g 0,966 mol, 1,0 equiv.) seguido por cloruro de 4-clorobencenosulfonilo (215,22 g 0,989 mol, 1,02 equivalentes, al 97% p/p %) y 1,6 l de THF a temperatura ambiente. Se añadió trietilamina (206,5 g, 2,04 mol, 2,1 equiv.) durante 20 min, manteniendo la temperatura del recipiente a $15\text{--}25^\circ\text{C}$, y la suspensión blanca resultante se agitó a $15\text{--}25^\circ\text{C}$ durante 30 min. Se añadió agua (1,4 l, 7 vol.) a la mezcla de reacción a $20\text{--}25^\circ\text{C}$ y después se eliminó THF (1,4 l, 7 vol.) mediante destilación a vacío (la temperatura del recipiente se mantuvo a $0\text{--}60^\circ\text{C}$ bajo 333,25–533,2 pascales (250–400 mm de Hg) durante el procedimiento de destilación). Cuando el procedimiento de destilación estuvo completo, se añadieron 1,4 l (7 vol.) de agua durante 30 min manteniendo mientras la temperatura del recipiente a $50\text{--}60^\circ\text{C}$, y la suspensión resultante se agitó a $50\text{--}60^\circ\text{C}$ durante 30 min y después se enfrió a 10°C . La suspensión se agitó durante no menos de 1 hora, y el producto se filtró. La torta del filtro se lavó con agua (600 ml cada lavado) hasta que el pH del lavado de la torta midió ≥ 5 . La torta se secó a vacío a no más de 70°C (temperatura de camisa) hasta que la pérdida al secar es $< 0,5\%$ p/p, dando el compuesto del título como un sólido blanco (300 g, rendimiento del 91%). RMN ^1H (DMSO- d_6) (400 MHz) δ 160–1,90 (dos m, 1H cada uno de CH_2), 2,10 – 2,35 (m, 2H de $\text{CH}_2\text{-CF}_3$), 3,85–3,88 (m, 1H, $-\text{CONH}_2$), 7,13 y 7,37 (sa, 1H, cada uno de CONH_2), 7,61 (m, 2H, Ar- H_a), 7,64 (m, 2H, Ar- H_b), 8,18 (d, 1H, J = 8,0 Hz, NH- SO_2). RMN ^{13}C (DMSO- d_6) (100,0 MHz) δ 171,75, 140,27, 137,77, 131,71, 129,56, 128,95, 126,22, 55,12, 30,1, 29,82, 29,53, 29,25, 25,82, 25,79.

35 **Etapa B. (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida**



Etapa B, Procedimiento 1.

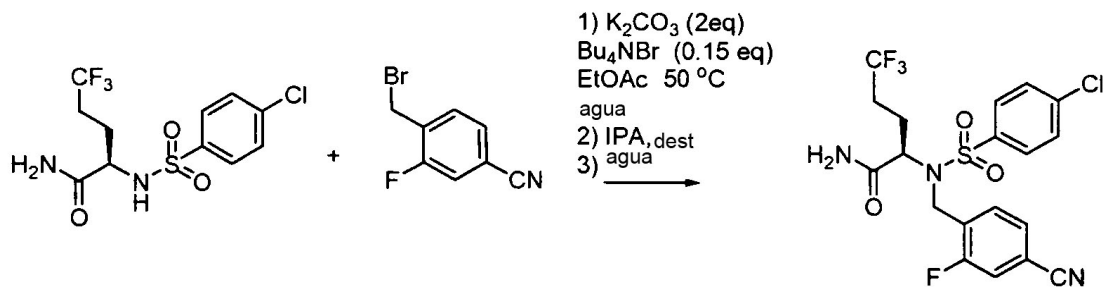
Se cargó un recipiente adecuado con 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (492,14 g, 1,10 equiv., 1,914 mol), (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (600 g, 1,00 equiv.; 1,74 mol) carbonato de cesio (312,22 g, 0,55 equiv.; 0,98 mol), yoduro de tetra-n-butilamonio (64,29 g, 0,10 equiv.; 0,17 mmol), y acetonitrilo (9 ml/g; 5,4 l). La camisa se calentó a 40°C (38°C internos). La reacción se siguió mediante HPLC hasta que (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue < 5 PA. El recipiente se enfrió a una temperatura interna de 20°C y se añadió agua (5,4 l). Las fases se separaron y la fase rica en producto estaba en la parte superior. La fase del fondo se descartó. Se cargó agua (3,7 l) durante 18 minutos, y la reacción se mantuvo durante 20 h a 20°C y después se filtró. Se añadió agua (6 l) al vaso y se agitó para facilitar la transferencia del sólido adherido al agitador y paredes del vaso. La torta en bruto se lavó una vez con el agua usada para aclarar el reactor. La torta en bruto se secó en bandejas a vacío a 50°C. La torta en bruto, seca, pesó 699 g. La torta se transfirió a un reactor de 10 l y se cargó THF (2,025 l) seguido por solución de hidroxilamina (50% en agua) (42,97 ml, 0,40 equiv., 0,696 mol). La camisa del reactor se calentó a 40°C. La reacción se siguió mediante HPLC hasta que la (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue <0,4 PA. La reacción se enfrió a 20°C, se añadió agua (2 l) y la reacción se agitó a 20°C durante 30 minutos. Las fases se separaron y la fase orgánica se trató con heptano (8 l) agitándose mientras y la reacción se hizo oleaginosa, después precipitó.

La suspensión se dejó estar a 20°C durante 2 h, y la reacción se filtró y la torta se lavó con heptano (2 l). La torta en bruto se secó en bandeja a vacío a 40-50°C y pesó 613 g después de secar a < 1% de pérdida en secado. El producto en bruto se volvió a transferir al vaso junto con MeOH (3,678 l) y MeCN (1,226 l). La camisa se calentó a 60°C (interna 52°C) llevando a cabo disolución completa, y se añadió agua (2,023 l) a esa temperatura lentamente, manteniendo una temperatura interna de > 50°C. Cuando la adición de agua se completó, la solución se enfrió a una temperatura interna de 15°C durante 4 horas mientras que tiene lugar la cristalización. Se cargó agua adicional al reactor (400 ml) y la reacción se filtró y las aguas madres se devolvieron al vaso. Las aguas madres se agitaron durante 2 minutos liberando cualquier producto adherido dentro del vaso. La torta en bruto se lavó con aguas madres seguidas por heptanos (1,500 l). El producto se secó en bandeja a 40-50°C hasta que la pérdida al secar fue < 0,5% dando (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil]][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida como un sólido brillante, blanquecino (577,6 g, rendimiento del 63,76%).

Etapa B, Procedimiento 2.

A un recipiente adecuado se añadieron (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (2,68 kg, 7,77 mol, 1 eq.), 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (2,00 kg, 7,78 mol, 1 eq.), carbonato de cesio (1,65 kg, 5,06 mol, 0,65 eq.), yoduro de tetrabutilamonio (0,29 kg, 0,78 mol, 0,1 eq.) y acetonitrilo (12,0 l 4,5 l/kg). La reacción se calentó a 35°C hasta completarse mediante HPLC (3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol <0,5 PA relativa por HPLC). La reacción se enfrió a 15°C y se añadió agua (10,72 l/kg) con agitación seguida por ácido acético glacial (0,22 kg) llevando el pH de la reacción a <6,5. La agitación se detuvo y las fases se separaron (la fase superior contenía todo el producto). A la fase rica en producto se añadió tolueno (26,8 kg, 31 l, 10 kg/kg) seguido por solución de salmuera (20% p/p, 6,39 kg, 2 l/kg) y las fases se separaron (la fase superior contenía el producto). La mezcla se destiló a ~50°C a vacío (20000 pascales (200 mbar)) hasta que se eliminó el acetonitrilo. La concentración se ajustó con tolueno adicional si se necesitó para asegurar después de la destilación que el volumen total en el reactor fuera ~10 l/kg. Se cargó alcohol isopropílico (0,48 kg, 0,2 l/kg) y el lote se enfrió a 15°C iniciando cristalización. La suspensión resultante se filtró y se lavó con tolueno frío (18,65 kg, 21,56 l, 8 l/kg). La torta en bruto se secó en bandeja a vacío a 50°C hasta que la pérdida al secar fue <1,0%. La torta seca se añadió a reactor de 100 ml junto con alcohol isopropílico (27,34 kg, 34,8 l, 13 l/kg) e hidroxilamina (solución acuosa al 50%, 0,05 kg, 1,51 mol, 0,2 eq.). La mezcla se calentó a 65°C y se siguió mediante HPLC hasta que la (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue <0,4 PA. La reacción se destiló después (temperatura del recipiente ~50°C, 30000 pascales (300 mbar) de vacío) hasta que el volumen de reacción fue ~60% del original. Se cargó acetonitrilo (5,36 kg, 2 l/kg) y la temperatura de reacción se incrementó a 70°C logrando la disolución completa. Se cargó agua (11,26 l, 4,2 l/kg) lentamente manteniendo la temperatura de reacción >65°C. La reacción se enfrió a 15°C durante 2 horas y tuvo lugar una cristalización. La suspensión se filtró y se lavó con alcohol isopropílico acuoso frío (IPA:agua 2:1 en volumen). La torta se secó en un horno a vacío hasta que la pérdida en secado fue <1%. El producto se recristalizó después disolviendo en acetonitrilo (2 l/kg en base al peso de introducción de torta seca) y metanol (6 l/kg) y después se calentó a 50°C. Se añadió lentamente agua (4 l/kg), manteniendo la temperatura de reacción >50°C. La reacción se enfrió a 15°C durante 2 horas. La suspensión resultante se filtró y lavó con una solución de metanol:acetonitrilo:agua (6:2:4, 5 l/kg) dando (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil]][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (2,02 kg, rendimiento del 50%) como un sólido blanco.

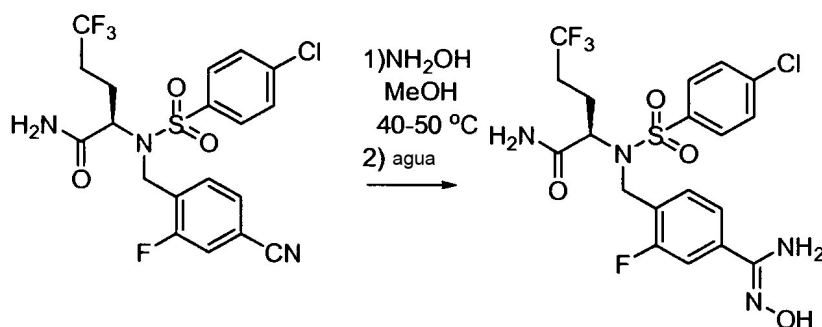
Ejemplo 4**(2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil]][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida****Etapa A. (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil]][[4-ciano-2-fluorofenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida**



5 Se cargaron (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (3,444 kg), carbonato de potasio (2,774 kg), bromuro de tetrabutilamonio (0,484 kg), y 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo (2,092 kg) en un reactor. Se cargaron después acetato de etilo (17,2 l) y agua (3,44 l) y el lote se calentó a 50°C hasta que se completó por HPLC (<1 de material de partida de PA relativa). La reacción se completa normalmente en aproximadamente 15 horas. El lote se enfrió a 15-20°C y se cargó agua (6,88 l) y la fase acuosa del fondo se separó. Se cargó una solución de fosfato sódico monobásico (0,2 M en agua, 20,66 l) y la fase acuosa del fondo se separó y el pH se probó asegurando que era <6,5. (Nota: si el pH es >6,5, se pueden cargar 20,66 l de una solución monobásica de fosfato de sodio adicional 0,2 M y la extracción y la medida de pH se repitieron). El disolvente se intercambió después mediante una destilación a vacío de volumen constante. El reactor se situó a vacío (359,91 pascales (270 mm de Hg)) y la camisa se calentó a 75-80°C. Una vez comenzó la destilación de acetato de etilo, se añadió isopropanol (41,34 L) a la misma velocidad de la recogida del destilado, y el volumen del lote total se mantuvo a un nivel constante. Una vez se añadió todo el isopropanol, el vacío se liberó y se cargó el agua (13,76 l). La temperatura del lote se mantuvo a aproximadamente 50°C durante la adición de agua. El lote se enfrió después a 15-20°C y se filtró. La torta húmeda se lavó con isopropanol acuoso al 50% (v/v) (4 x 21,6 kg) y después se secó en bandeja a vacío a 50°C dando el compuesto del título como un sólido blanquecino (3,648 kg, rendimiento del 78%). RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,42-1,55 (m, 1H) 1,80-1,93 (m, 1H) 2,00-2,15 (m, 2H) 4,44 (dd, J = 7,91, 1,13 Hz, 1H) 4,68 (d, J = 17,71 Hz, 1H) 4,99 (d, J = 17,71 Hz, 1H) 7,26 (s, 1H) 7,50 (s, 1H) 7,63-7,73 (m, 4H) 7,78-7,87 (m, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) ppm 22,58-22,97 (m, 1C) 29,96 (d, J = 29,09 Hz, 1C) 41,46 (d, J = 5,49 Hz, 1C), 57,86, 110,97, 111,45 (d, J = 10,43 Hz, 1C), 117,58, 119,11 (d, J = 25,80 Hz, 1C), 124,89, 128,53, 128,56, 129,21, 131,17, 131,98, 137,44, 138,32, 158,99 (d, J = 247,54 Hz, 2C), 170,25. RMN ^{19}F , (CDCl $_3$, 282 MHz) δ : -116,5, -65,9. IR (KBr): 3443, 3342, 3210, 2955, 2245, 1699, 1577, 1476, 1163 cm^{-1} .

Análisis Calculado. para $C_{19}H_{16}ClF_4N_3O_3S$ Calc.: C, 47,75; H, 3,37; N, 8,79; S, 6,71; F, 15,90; Cl, 7,41. Hallado: C, 47,95; H, 3,31; N, 8,67; S, 6,72; F, 15,59; Cl, 7,49.

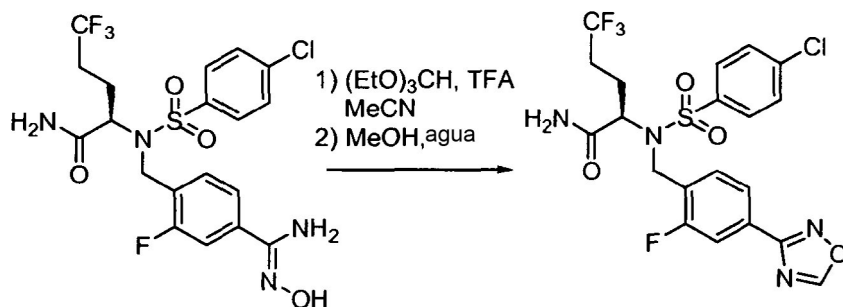
25 **Etapa B. (R)-2-((4-cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxicarbamimidóil)encil)fenil)sulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida**



30 Se cargaron (2R)-2-[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]-(4-ciano-2-fluorofenil)metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (399 g) y metanol (1,6 l) en un reactor seguido por hidroxilamina (solución al 50% en agua, 93 ml, 1,8 eq.). La mezcla se calentó a 45-50°C hasta completar la reacción mediante HPLC (material de partida de PA relativa <0,15). Se cargó lentamente agua (0,5 l), manteniendo la temperatura del lote entre 30-50°C. El lote se dejó permanecer hasta que empezó la cristalización y después se cargó agua (2,7 l). El lote se enfrió a 15-20°C y se filtró. La torta se lavó con MeOH:agua 2:1 (2 l) y después se secó en bandeja a vacío a 50°C dando el compuesto del título como un sólido blanco (415 g, rendimiento del 96%). RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1,43-1,64 (m, 1H) 1,77-1,93 (m, 1H) 1,93-2,17 (m, 2H) 4,41 (dd, J = 8,48, 6,03 Hz, 1H) 4,60 (d, J = 17,14 Hz, 1H) 4,94 (d, J = 16,77 Hz, 1H) 5,81 - 5,98 (m, 2H) 7,19-7,27 (m, 1H) 7,37-7,47 (m, 2H) 7,52 (d, J = 4,14 Hz, 2H) 7,64 (d, J = 8,67 Hz, 2H) 7,85 (d, J = 8,85 Hz, 2H) 9,71-9,83 (m, 1H). IR (KBr): 3491, 3379, 1680, 1651, 1592, 1433, 1343.

Análisis Calculado para $C_{19}H_{19}ClF_4N_4O_4S$ Calc.: C, 44,66; H, 3,74; N, 10,96; S, 6,27; F, 14,87; Cl, 6,94. Hallado: C, 44,90; H, 3,91; N, 10,91; S, 6,41; F, 15,21; Cl, 6,95.

40 **Etapa C. (2R)-2-[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]-(2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil)metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida**



- 5 Se cargó (R)-2-(4-cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxycarbamimidoyl)benzil)-fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (246 g) en un reactor seguido por acetonitrilo seco (509 ml), ortoformiato de trietilo (120 ml), y ácido trifluoroacético (7 ml). La solución se calentó a 40-50°C hasta que la reacción se completó mediante HPLC (material de partida de PA relativa <0,15). Se cargó metanol (1,48 l) de una vez, seguido por agua (1,034 l), manteniendo el lote a 45-50°C. El lote se enfrió después a 15-20°C y se filtró. La torta se lavó con MeCN:MeOH:agua 2:6:5 y se secó en una bandeja a vacío a 50-60°C, dando el compuesto del título como un sólido blanco (228 g, rendimiento al 90%).
- 10 RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,40-1,58 (m, 1H) 1,75-1,90 (m, 1H) 1,92-2,07 (m, 1H) 2,10-2,26 (m, 1H) 4,37 (dd, J = 8,67, 6,22 Hz, 1H) 4,48 (d, J = 15,64 Hz, 1H) 4,64 (d, J = 15,82 Hz, 1H) 5,54 (s, 1H) 6,33 (s, 1H) 7,44-7,54 (m, 2H) 7,62 (t, J = 7,72 Hz, 1H) 7,68-7,76 (m, 3H) 7,85 (dd, J = 7,91, 1,51 Hz, 1H) 8,76 (s, 1H). RMN ^{13}C , (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 170,34, 167,75, 165,80, 159,64 (d, J = 244,5 Hz, 1C), 138,19, 137,64, 131,25 (d, J = 3,75 Hz, 1C), 129,31, 129,23, 129,05 (d, J = 14,25 Hz, 1C), 126,74 (c, J = 274,5 Hz, 1C), 126,91, 126,80, 123,12 (d, J = 3,75 Hz, 1C), 113,7 (d, J = 24,0 Hz, 1C), 57,92, 41,38 (d, J = 4,5 Hz, 1C), 30,04 (d, J = 30,0 Hz, 1C), 22,90. RMN ^{19}F , (CDCl_3 , 282 MHz) δ : -116,5, -66,5. IR (KBr): 3454, 334, 3286, 2952, 1705, 1432, 1325, 1260, 1167, 1084, 828 cm^{-1} .
- 15 Análisis Calculado. para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ Calculado C, 46,11; H, 3,29; N, 10,71; S, 6,15; F, 14,58; Cl, 6,80. Hallado C, 46,06; H, 3,24; N, 10,71; S, 6,25; F, 14,60; Cl, 6,88.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto que es (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida o uno de sus solvatos o hidratos.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (2R)-2-[[[4-clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida o uno de sus solvatos o hidratos en asociación con un coadyuvante, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o el retardo de la aparición de la enfermedad de Alzheimer, angiopatía amilode cerebral, deterioro cognitivo leve y/o síndrome de Down.
4. El compuesto de la reivindicación 3 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10