

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 363**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2009** **E 09789527 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 2408450**

54 Título: **Compuesto de alfa-(N-sulfonamido)acetamida como un inhibidor de la producción de péptido beta amiloide**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2013

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543-4000 , US

72 Inventor/es:

STARRETT, JR., JOHN, E.;
GILLMAN, KEVIN, W. y
OLSON, RICHARD, E.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 406 363 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

Compuesto de alfa-(N-sulfonamido)acetamida como un inhibidor de la producción de péptido beta amiloide

Campo de la invención

La presente invención describe (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que tiene propiedades como fármaco y de acción biológica, sus composiciones farmacéuticas, procedimientos de las mismas y procedimientos de uso. El nuevo compuesto posee una inhibición única de producción del péptido A β , que actúa por lo tanto para prevenir la acumulación de los péptidos A β y/o depósitos de proteína amiloide en el cerebro, y que es útil en el tratamiento de traumatismo craneal, lesión cerebral traumática, demencia pugilística, y/o otras afecciones asociadas con el péptido β -amiloide.

Antecedentes

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

Un diagnóstico definitivo de la EA para un paciente demente requiere una evaluación histopatológica del número y localización de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares después de la autopsia (Recomendaciones consensuadas para el diagnóstico post mortem de la enfermedad de Alzheimer. Neurobiol. Aging, 18: S1-S2 (1997)). 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 en etapas de la proteína precursora de amiloides (APP) mediante una enzima de escisión de APP en el sitio β (BACE), para generar el extremo N, y γ secretasa, para generar el extremo C (Selkoe, D.J., Physiol. Rev., 81: 741-766 (2001)). La γ secretasa es un complejo de proteína transmembrana que incluye Nicastrina, Aph-1, PEN-2, y Presenilina-1 (PS-1) o Presenilina-2 (PS-2) (Wolfe, M.S. y col., Science, 305: 1119-1123 (2004)). Se cree que PS-1 y PS-2 contienen los sitios catalíticos de la γ secretasa.

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

La γ secretasa escinde múltiples proteínas transmembrana de tipo I además de APP (Pollack, S.J. y col., Curr. Opin. Investig. Drugs, 6: 35-47 (2005)). Aunque el significado fisiológico de la mayoría de estos eventos de escisión es desconocido, la evidencia genética indica que la escisión de la γ secretasa de Notch es necesaria para la señalización de Notch (Artavanis-Tsakonas, S. y col., Science, 284 (5415): 770-776 (1999); Kadesch, T., Exp. Cell Res., 260 (1): 1-8 (2000)). En roedores dosificados con inhibidores de γ secretasa, la toxicidad relacionada con fármacos se ha identificado en el tracto gastrointestinal (GI), timo, y bazo (Searfoss, G.H. y col., J. Biol. Chem., 278: 46107-46116 (2003); Wrong, G.T. y col., J. Biol. Chem., 279: 12876-12882 (2004); Milano, J. y col., Toxicol. Sci., 82: 341-358 (2004)). Estas toxicidades están probablemente relacionadas con la inhibición de la señalización de Notch (Jensen, J. y col., Nat Genet., 24: 36-44 (2000)).

La identificación de toxicidad basada en mecanismos plantea la cuestión de si se puede conseguir un índice terapéutico aceptable con inhibidores de γ secretasa. La inhibición selectiva de la formación de A β durante el procesamiento de Notch, farmacocinéticas, disposición de fármacos, y/o farmacodinámica específica de los tejidos podrían impactar sobre el margen terapéutico.

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

La producción en exceso y/o la eliminación reducida de A β causa CAA (Thal, D. y col., J. Neuropath. Exp. Neuro., 61: 282-293 (2002)). En estos pacientes, los depósitos amiloides vasculares causan degeneración de las paredes vasculares y aneurismas que pueden ser responsables de un 10-15 % de las apoplejías hemorrágicas en pacientes

de edad avanzada. Como en la EA, las mutaciones en el gen que codifica A β conducen a una forma de aparición temprana de CAA, mencionada como hemorragia cerebral con amiloidosis del tipo holandés, y los ratones que expresan esta proteína mutante desarrollan CAA que es similar a la de los pacientes. Los compuestos que se dirigen específicamente a la γ secretasa podrían reducir o evitar CAA.

La DLB se manifiesta con alucinaciones visuales, ilusiones, y Parkinson. Resulta interesante que las mutaciones familiares de la EA que causan depósitos de A β también pueden causar cuerpos de Lewy y síntomas de DLB (Yokota, O. y col., *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 104: 637-648 (2002)). Además, los pacientes esporádicos de DLB tienen depósitos de A β similares a los de la EA (Deramecourt, V. y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65: 278-288 (2006)). En base a estos datos, A β probablemente conduce a patología de los cuerpos de Lewy en DLB y, por lo tanto, los inhibidores de γ secretasa podrían reducir o evitar la DLB.

Aproximadamente un 25 % de los pacientes de ALS tienen demencia o afasia significativa (Hamilton, R.L. y col., *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 107: 515-522 (2004)). La mayoría (~ 60 %) de estos pacientes, denominados ALS-D, contienen inclusiones positivas de ubiquitina compuestas principalmente de la proteína TDP-43 (Neumann, M. y col., *Science*, 314: 130-1,33 (2006)). Aproximadamente un 30 % de los pacientes ALS-D tienen placas amiloides coherentes con A β que causan su demencia (Hamilton, R.L. y col., *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 107: 515-522 (2004)). Estos pacientes deberían ser identificables con agentes de formación de imágenes de amiloide y ser potencialmente tratables con inhibidores de γ secretasa.

La IBM es una rara enfermedad degenerativa del músculo esquelético relacionada con la edad. La aparición de depósitos de A β en el músculo con IBM y la recapitulación de varios aspectos de la enfermedad al dirigir la sobreexpresión de APP hacia el músculo en ratones transgénicos apoya el papel de A β en la IBM (revisado en Murphy, M.P. y col., *Necrology*, 66: S65-S68 (2006)). Los compuestos que se dirigen específicamente a la γ secretasa podrían reducir o evitar la IBM.

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

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

Los compuestos que inhiben la gamma secretasa también pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones, por ejemplo esclerosis múltiple, asociadas con la pérdida de mielinación (Watkins, T.A. y col., *Neuron*, 60: 555-569 (2008)).

Un estudio reciente realizado por investigadores del Centro Médico de la Universidad de Georgetown sugiere que los inhibidores de gamma secretasa pueden prevenir el daño a largo plazo de una lesión cerebral traumática (Loane, D.J., y col., *Nat. Med.*, 1-3 (2009)).

Smith y col. en la Solicitud Internacional WO 00/50391, publicada el 31 de Agosto de 2000, desvelan una serie de compuestos de sulfonamida que pueden actuar para modular la producción de la proteína β amiloide como un medio para tratar una diversidad de enfermedades, especialmente la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades que se relacionan con la deposición de amiloides.

La Patente Japonesa N° 11343279, publicada el 14 de diciembre de 1999 desvela una serie de derivados de sulfonamida que son inhibidores de TNF-alfa útiles para tratar enfermedades autoinmunes.

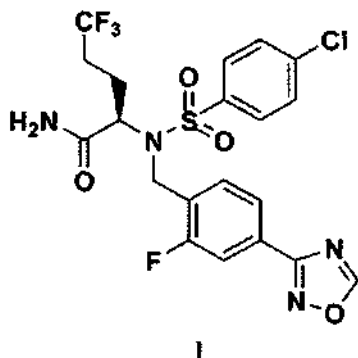
Parker y col. en la Solicitud Internacional WO 03/053912, publicada el 3 de julio de 2003, desvelan una serie de derivados de α -(N-sulfonamido)acetamida como inhibidores de β -amiloide que son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras afecciones asociadas con el péptido β -amiloide.

El nuevo compuesto de la presente invención que pertenece a la definición de la Fórmula en el documento WO 03/053912 no se desvela o describe por Parker y col. Sorprendentemente, se ha descubierto que (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl][2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida posee características únicas que la hacen útil para el tratamiento de traumatismo craneal, lesión cerebral traumática, y/o demencia pugilística.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl][2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida que tiene la Fórmula I, a sus formulaciones farmacéuticas, para uso en la inhibición de la

producción de A β en pacientes que padecen o que son susceptibles de traumatismo craneal, lesión cerebral traumática, y/o demencia pugilística.



La presente invención describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]methyl]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en asociación con un adyuvante, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de la presente invención también es útil para el tratamiento, alivio o retraso del inicio de los trastornos asociados con el péptido β -amiloide, especialmente la enfermedad de Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral, deterioro cognitivo leve, y síndrome de Down mediante la administración junto con un adyuvante, vehículo o diluyente convencional de una cantidad terapéuticamente eficaz de (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]methyl]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida o solvato o hidrato de la misma.

También se desvela un procedimiento para la preparación de (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]methyl]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 preferentemente una base inorgánica tal como carbonato de cesio.

También se desvela un procedimiento para la preparación de (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonyl]methyl]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'-hidroxycarbamimidoil)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 enantioméricas individuales del compuesto de Fórmula I e intermedios quirales y racémicos como se describen en el presente documento. Se pretende que el uso de una denominación simple tal como (R) o (S) incluya principalmente 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 habitual después de la introducción de agrupamientos adecuados formadores de sal, *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 los compuestos libres. Las formas enantiómeras también se pueden separar mediante fraccionamiento a través de columnas quirales de cromatografía líquida a alta presión.

En el uso terapéutico de la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad total de cada componente activo que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, es decir, curación de afecciones asociadas con el péptido β -amiloide de acuerdo con las reivindicaciones. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, el término se refiere solamente a ese ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, si se administra en combinación, en serie o simultáneamente. Los términos "tratar, que trata, tratamiento" como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones se refieren a prevenir, retrasar, suprimir o mejorar las enfermedades asociadas con el péptido β -amiloide, de acuerdo con las reivindicaciones.

El compuesto de Fórmula I se puede usar en combinación con otros fármacos que se usan en el tratamiento/prevenición/supresión o mejora de las enfermedades o afecciones para las que es útil el compuesto de Fórmula I. Dichos otros fármacos se pueden administrar mediante una vía y en una cantidad usada comúnmente

para ello, al mismo tiempo o secuencialmente con el compuesto de la presente invención. Cuando el compuesto de Fórmula I se usa al mismo tiempo con uno u otros fármacos más, es preferente una composición farmacéutica que contiene dichos fármacos además del compuesto de Fórmula I. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento incluyen aquéllas que también contienen uno u otros principios activos más, además del compuesto de Fórmula I. Los ejemplos de otros principios activos que se pueden combinar con (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonyl][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida, administrados separadamente o en las mismas composiciones farmacéuticas, para tratar la enfermedad de Alzheimer incluyen, pero no se limitan a: la clase de fármacos que son inhibidores de la 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 AINE, tales como R-flurbiprofeno (FLURIZAN®); los fármacos de estatina que reducen el colesterol tales como pravastatina, simvastatina, y atorvastatina; terapia inmune anti-amiloide y anti-Aβ; compuestos que inhiben la agregación de Aβ, tales como esciloinositol y clioquinol; otros compuestos que inhiben o que modifican la producción o el procesamiento de Aβ tales como inhibidores de la γ secretasa, inhibidores de la β secretasa, moduladores de la γ secretasa, moduladores de Aβ, e inhibidores de GSK-3; compuestos que regulan la renovación de Aβ tales como inhibidores de PAI-1; compuestos que regulan la tau fosforilación tales como los inhibidores GSK-3 y CDK-5; agonistas de PPARγ tales como rosiglitazona; compuestos que regulan la renovación de tau o fósforo-tau, u oligomerización tales como inhibidores de HSP90, inhibidores de HDAC y terapia inmune anti-tau; y compuestos que estabilizan o que 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 del cáncer, el compuesto de la presente invención se puede usar con agentes o tratamientos anticáncer conocidos. Dichos agentes y tratamientos incluyen agentes citotóxicos/citostáticos, moduladores del receptor de andrógenos, moduladores del receptor de estrógenos, moduladores del receptor retinoides, inhibidores de prenil-protein transferasas, inhibidores de la 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 el lupus.

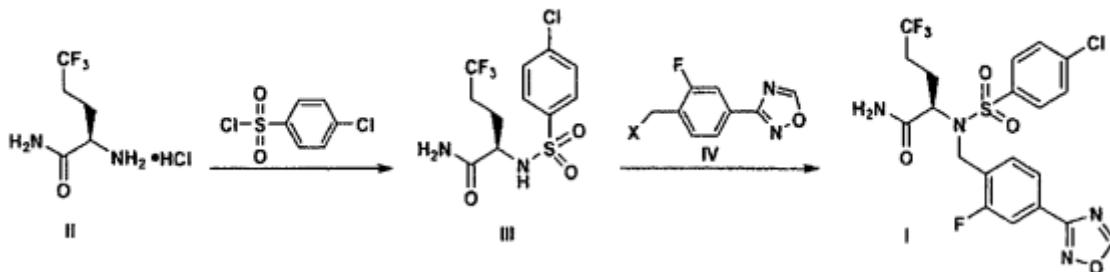
Los agentes terapéuticos anteriores, cuando se usan en combinación con el compuesto de la presente invención, se pueden usar, por ejemplo, en las cantidades indicadas en Physicians' Desk Reference (PDR), cuando sean aplicables o como las determine de otro modo un experto habitual en la materia.

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

Esquemas de Reacción Generales

El compuesto de la presente invención se puede preparar en un número de diferentes rutas bien conocidas por el experto en la técnica de la síntesis orgánica. El compuesto de Fórmula I se puede preparar mediante los procedimientos que se describen a continuación en los Esquemas de Reacción 1-5.

Esquema de Reacción 1

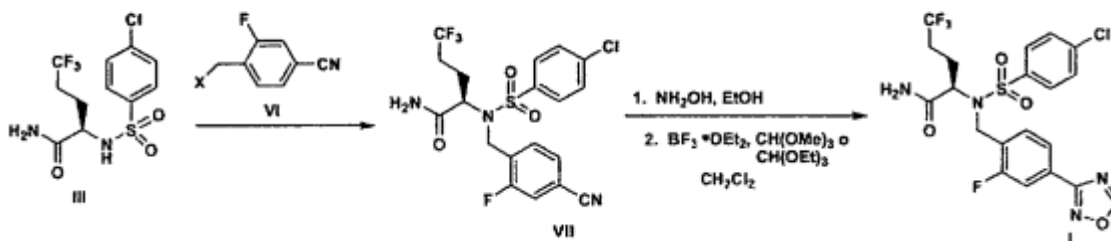


En un procedimiento de preparación ilustrado en el Esquema de Reacción 1, la (α-amino)acetamida de partida de Fórmula II que se usa básicamente en forma enantioméricamente pura se puede preparar mediante procedimientos bien conocidos en la literatura tales como el uso del procedimiento de síntesis asimétrica de Strecker que se describe en el Esquema de Reacción 3 para la conversión de trifluorobutiraldehído en la (α-amino)acetamida de Fórmula II, o como alternativa a partir de (R)-5,5,5-trifluoronorvalina (véase Ojima, I., J. Org. Chem., 54: 4511-4522 (1989)) y el procedimiento que se describe en el Esquema de Reacción 4 seguido de los procedimientos generales para la preparación de amidas: Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Nueva York, págs. 972-976 (1989). La (α-amino)acetamida de Fórmula II se trata con una base adecuada y se sulfonila con cloruro de p-clorosulfonylo en un disolvente aprótico adecuado tal como CH₂Cl₂ a aproximadamente temperatura

ambiente para proporcionar la (α -sulfonamido)acetamida de Fórmula III. Las bases adecuadas incluyen trietilamina, diisopropilamina, piridina y similares.

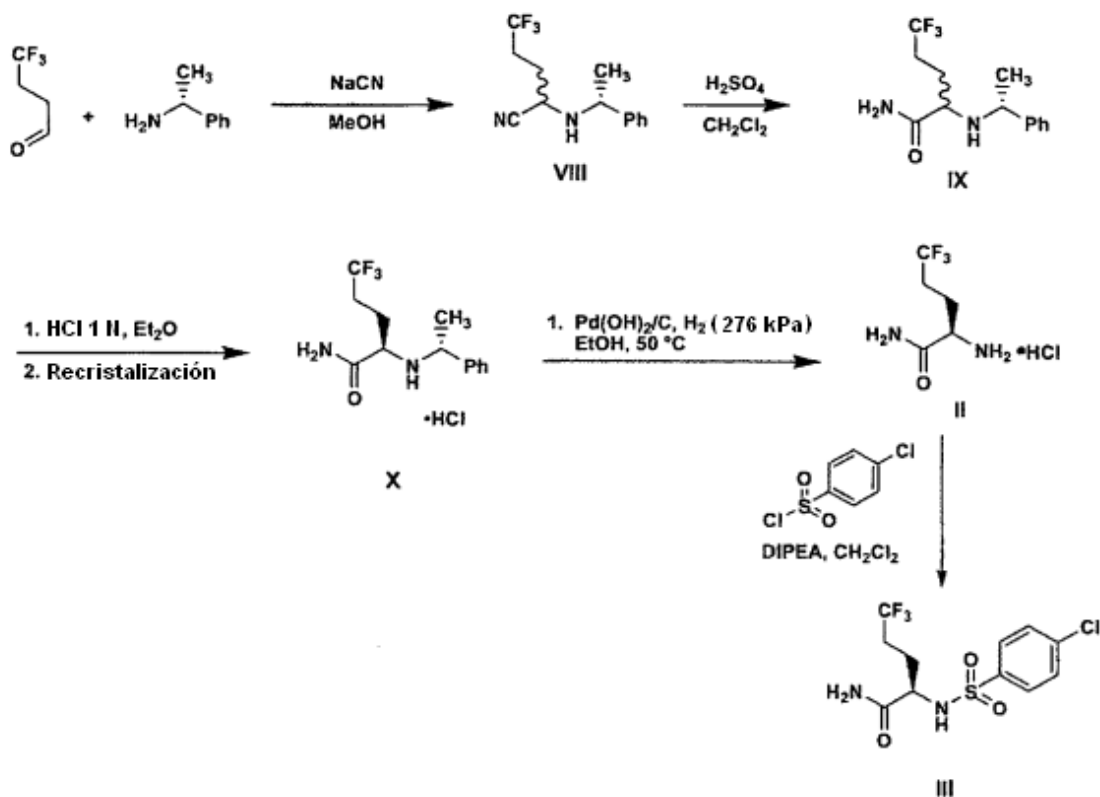
La conversión del compuesto de Fórmula III en la sulfonamida de Fórmula I se realiza en presencia de una base haciendo reaccionar la (α -sulfonamido)acetamida de Fórmula III con un agente de alquilación de fluorobencil oxadiazol de Fórmula IV en un disolvente aprótico adecuado con o sin calentamiento.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

Esquema de Reacción 2

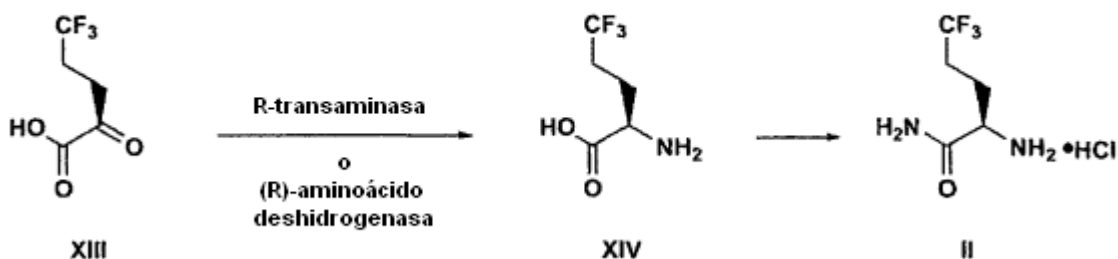


En otro procedimiento de preparación ilustrado en el Esquema de Reacción 2, el compuesto 1,2,4-oxadiazol de Fórmula I se prepara por alquilación del compuesto de Fórmula III con un derivado de 2-ciano-4-fluorobencilo de Fórmula VI en la que X es un grupo saliente en presencia de una base en un disolvente adecuado para producir el nitrilo de Fórmula VII. El compuesto deseado de Fórmula I se prepara después a partir del compuesto de nitrilo de Fórmula VII usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (ref: Joule, J.A. y col., Heterocyclic Chemistry, 3ª ed., Chapman y Hall, Londres, págs. 452-456 (1995) y referencias citadas en ese documento). 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 proporciona una oxima de amida intermedia que posteriormente se trata con un ortoformiato (tal como ortoformiato de trietilo o de trimetilo) en presencia de una fuente de ácido 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

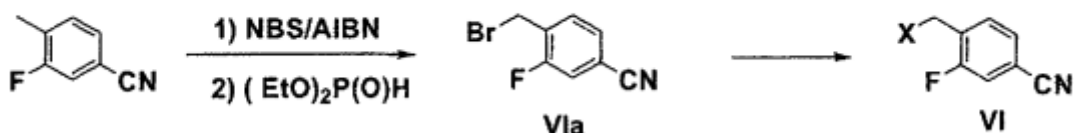


Esquema de Reacción 4



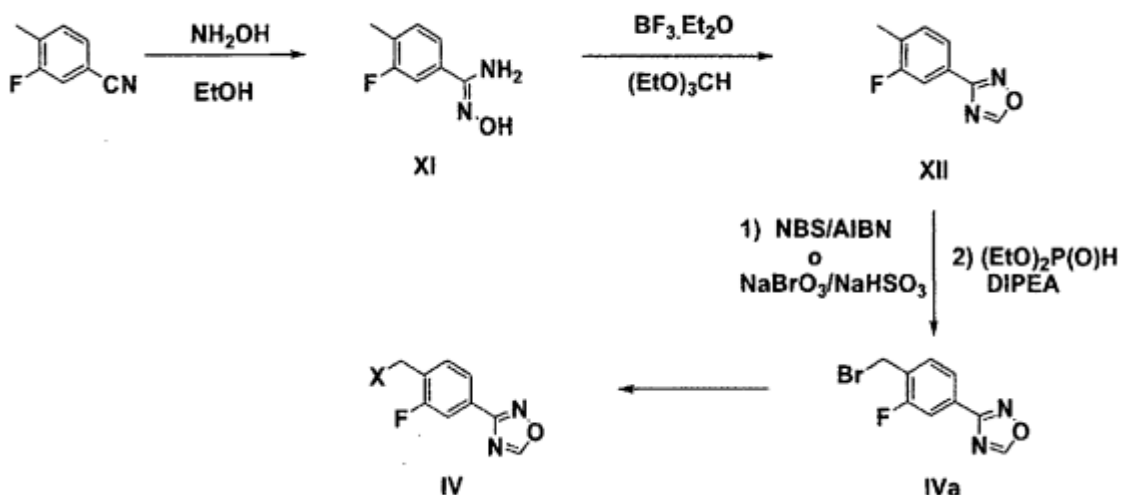
mercado. Los procedimientos enzimáticos se realizan usando los procedimientos que se describen a continuación y procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. La conversión de la (R)-5,5,5-trifluoronorvalina de Fórmula XIV en el compuesto de Fórmula II se puede realizar usando procedimientos generales para la preparación de amidas bien conocidos en la técnica.

Esquema de Reacción 5



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

Esquema de Reacción 6



Como una alternativa al uso del compuesto de Fórmula VI en la secuencia lineal a la oxadiazol sulfonamida de Fórmula I descrita anteriormente en el Esquema de Reacción 2, la preparación del compuesto de Fórmula IV para su uso en la ruta convergente representada en el Esquema de Reacción 1 se muestra en el Esquema de Reacción 6. El tratamiento de 2-fluoro-4-cianotolueno disponible en el mercado con hidroxilamina a temperatura ambiente en un disolvente alcohólico proporciona la oxima de amida en bruto de Fórmula XI, que se puede usar directamente en la siguiente reacción. La ciclación de la oxima de amida de Fórmula XI por tratamiento con eterato de trifluoruro de boro y ortoformiato de trietilo proporciona el oxadiazol de Fórmula XII con un rendimiento superior a un 90 % en dos etapas. Como una alternativa al uso de trifluoruro de boro, la ciclación también se puede conseguir limpiamente usando ácido trifluoroacético como la fuente de ácido. La bromación con N-bromosuccinimida en un disolvente adecuado tal como diclorometano, dicloroetano, o tetracloruro de carbono usando un iniciador tal como AIBN proporciona el compuesto monobromo oxadiazol de Fórmula IVa. Si se desea evitar posibles mezclas de mono- y dibromuros, la función toluilo del compuesto de Fórmula XI se puede bromar deliberadamente en exceso con N-bromosuccinimida y AIBN para proporcionar el dibromuro correspondiente que después se puede reducir con fosfito de dietilo para proporcionar el monobromuro de Fórmula VIa con un rendimiento superior a un 90 %. La dibromación y la reducción se pueden conseguir en un recipiente sin aislamiento del dibromuro con un rendimiento global superior a un 90 %. Como alternativa, el compuesto de Fórmula IVa también se puede preparar a partir del compuesto de Fórmula XII con exceso de bromato sódico y bisulfito sódico en un sistema de disolvente de dos fases adecuado tal como acetato de etilo/agua, diclorometano/agua, acetato de butilo/agua, trifluorotolueno/agua y similares para proporcionar una mezcla de compuestos 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 se puede convertir fácilmente en el compuesto de Fórmula IV en la que X es un grupo saliente

mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

La presente invención describe composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de Fórmula I en combinación con un adyuvante, vehículo o diluyente farmacéutico.

5 En otra realización más, la presente invención describe un procedimiento para el tratamiento de traumatismo craneal, lesión cerebral traumática, y/o demencia pugilística, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I o un solvato o hidrato del mismo a un mamífero en necesidad del mismo.

10 En otra realización más, la presente invención describe un procedimiento para el tratamiento de traumatismo craneal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I o un solvato o hidrato del mismo a un mamífero en necesidad del mismo.

En otra realización más, la presente invención describe un procedimiento para el tratamiento de lesión cerebral traumática que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I o un solvato o hidrato del mismo a un mamífero en necesidad del mismo.

15 En otra realización más, la presente invención describe un procedimiento para el tratamiento de demencia pugilística que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I o un solvato o hidrato del mismo a un mamífero en necesidad del mismo.

20 Para uso terapéutico, el compuesto farmacológicamente activo de Fórmula I normalmente se administrará en forma de una composición farmacéutica que comprende como el (o como un) principio activo esencial al menos uno de dichos compuestos en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable sólido o líquido y, opcionalmente, con adyuvantes y excipientes farmacéuticamente aceptables que usan técnicas estándar y convencionales.

25 Las composiciones farmacéuticas incluyen formas de dosificación adecuadas para la administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intradérmica e intravenosa), transdérmica, sublingual, bronquial o nasal. De este modo, si se usa un vehículo sólido, la preparación se puede comprimir, colocar en una cápsula de gelatina dura en polvo o en microgránulos, o en forma de un trocisco o pastilla para chupar. El vehículo sólido puede contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes de compresión, disgregantes, agentes humectantes y similares. El comprimido, si se desea, se puede revestir con una 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 revestimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener principios activos mezclados con una carga o con aglutinantes, tales como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, líquidos, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes. Si se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en 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 su reconstitución con agua o con otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulgentes, agentes humectantes, vehículos no acuosos (incluyendo aceites comestibles), conservantes, así como agentes aromatizantes y/o colorantes. Para la administración parenteral, un vehículo comprenderá normalmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque se pueden usar soluciones salinas, soluciones de glucosa y similares. También se pueden usar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden usar agentes de suspensión convencionales. También se pueden añadir conservantes convencionales, agentes de tamponamiento y similares para las formas de dosificación parenteral. Para la administración tópica o nasal, en la formulación se usan agentes penetrantes o de impregnación que son apropiados para la barrera particular a impregnar. Dichos 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 principio 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).

50 La dosificación del compuesto de Fórmula I para conseguir un efecto terapéutico dependerá no solamente de factores tales como la edad, el peso y el sexo del paciente y del 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 en particular o para la enfermedad implicada. Se contempla también que el tratamiento y la dosificación del compuesto de Fórmula I se pueden administrar en forma de dosificación individual y que la forma de dosificación individual la ajustaría en consecuencia alguien experto en la materia para reflejar el nivel relativo de actividad. La decisión en cuanto a la dosificación particular a usar (y el número de veces a administrarla al día) está dentro del criterio del médico, y se puede variar mediante valoración de la dosificación en las circunstancias particulares de la presente invención para producir el efecto terapéutico deseado.

Una dosis adecuada del compuesto de Fórmula I o una composición farmacéutica del mismo para un mamífero, incluyendo el ser humano, que padece, o que probablemente puede padecer cualquier afección relacionada con la

producción del 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 preferentemente, de aproximadamente 0,1 a 2 mg/kg cuando se administra parenteralmente. Para la administración oral, la dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg y preferentemente de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal. El principio activo se administrará preferentemente en dosis iguales de una a cuatro veces al día. Sin embargo, normalmente se administra una dosificación pequeña, y la dosificación se incrementa gradualmente hasta que se determina la dosificación óptima para el huésped en tratamiento. De acuerdo con la buena práctica clínica, se prefiere administrar el compuesto instantáneo a un nivel de concentración que produzca un efecto anti-amiloide eficaz sin causar ningún efecto secundario dañino o adverso. Sin embargo, se entenderá que la cantidad del compuesto administrado realmente la determinará un médico, a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección a tratar, la elección del compuesto a administrar, la vía de administración elegida, 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 responsable principalmente de la inducción del citocromo P450 (CYP) 3A4, que desempeña un papel principal en el metabolismo de muchos fármacos prescritos clínicamente. Se conoce bien que la inducción de CYP3A4 puede causar interacción fármaco-fármaco mediante el aumento de la eliminación metabólica de sustratos CYP3A4 coadministrados (Bertilsson, G. y col., Proc. Nat. Acad. Sci., Estados Unidos de América, 95: 12208-12213 (1998); Lehmann, J.M. y col., J. Clin. Invest., 102: 1016-1023 (1998)) o puede causar pérdida de exposición al fármaco debido a la autoinducción. Caracterizar el potencial de inducción del descubrimiento o el desarrollo de candidatos a fármacos ha llegado a ser un filtro importante en toda la industria farmacéutica. Un ensayo de transactivación de PXR se usa para evaluar el potencial de inducción de CYP3A4, y se usa un ensayo de citotoxicidad de células HepG2 para controlar la interferencia del ensayo debido a la citotoxicidad.

El medio de cultivo celular usado es DMEM. Se adquirieron lipofectamina 2000, PBS, tripsina-EDTA (0,25 %), y penicilina-estreptomycin en GIBCO/Invitrogen (Carlsbad, CA). Se adquirió suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) en Sigma (St. Louis, MO). Se adquirió carbón vegetal/dextrano tratado con suero bovino fetal (FBS) en Hyclone (Logan, UT). Se obtuvieron células HepG2 en ATCC (Manassas, VA). Se generaron PXR-pcDNA3 humano e indicador de luciferasa que contenía promotor de CYP3A4, CYP3A-Luc, en Bristol-Myers Squibb. Se adquirieron placas de 384 pocillos estándar negras en BD Biosciences (Lexington, KY). El sustrato de luciferasa (Steady-Glo) se adquirió en Promega (Madison, WI). El compuesto de control de rifampicina se adquirió en Sigma (St. Louis, MO).

El cultivo de células HepG2 se realiza en matraces T175 que usan DMEM que contiene FBS al 10 %. La mezcla de transfección contiene 1 μ g/ml de ADN de plásmido PXR-pcDNA3, 20 μ g /ml de ADN de plásmido Cyp3A-Luc, 90 μ l/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 medio recién preparado (20 ml por matraz), y los matraces se incuban a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante una noche.

Las células de cada matraz se lavan con PBS y se les añaden 4 ml de Tripsina-EDTA (0,25 %) y se incuban durante un minuto a temperatura ambiente. La tripsina después se retira por aspiración y los matraces se incuban durante un periodo adicional de cinco minutos a temperatura ambiente. Los matraces después se golpean con los dedos vigorosamente para descomponer los agregados celulares. Después de la adición de 10 ml de DMEM que contiene un 5 % de carbón vegetal/FBS tratado con dextrano, toda la mezcla 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 después se cuentan y se diluyen en medios de 3,0 x 10⁵ células/ml. Se añaden cincuenta μ l de mezcla celular a cada pocillo de una placa de 384 pocillos estándar negra que contienen 0,25 μ l del compuesto de ensayo disuelto en DMSO al 100 %. Las placas se incuban a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante una noche antes de que se añadan 25 μ l de sustrato de luciferasa a cada pocillo (Steady-Glo, Promega). Después de quince minutos, las placas se leen en un lector de placas Viewlux (Perkin-Elmer).

La rifampicina (10 μ M), un agonista bien conocido de PXR, está incluido en cada placa como un patrón interno y como control positivo. Los datos se expresaron después como activación porcentual (% de Act), en los que la señal total es la señal a partir de la rifampicina 10 μ M y la señal del blanco es la del vehículo de DMSO.

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

Los compuestos se ensayan a diez concentraciones (50 μ M - 2,5 nM, dilución en serie a 1:3), y se usa XL-Fit (IDBS, Inc.) para el ajuste de las curvas. Se indican las concentraciones del compuesto a las que se produce una activación de un 20 % y de un 60 % (EC20A y EC60A, respectivamente).

El receptor de pregnano X humano es responsable principalmente de la inducción de CYP3A4, así como de 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 una CE_{20A} (20 % de la respuesta de la Rifampicina a 10 μ M) de 6,9 μ M y una CE_{60A} (60 % de la respuesta de la Rifampicina a 10 μ M) de más de 16,7 μ M 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

Se evaluó 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 CYP3A4 *in vitro* usando la línea celular Fa2N-4. La célula Fa2N-4 es una línea inmortalizada de hepatocitos humanos que se creó usando el antígeno T del virus 40 de Simios (SV40) como el gen que se inmortaliza, mientras que retiene la expresión basal y la inducibilidad de diversos isoformas de CYP, que incluyen a CYP3A4. Las células Fa2N-4 y los Medios F de Soporte de MEF los proporcionó XenoTech, LLC (Lenexa, Kansas).

Las células Fa2N-4 se suministraron en placas de 12 pocillos, revestidas con colágeno a una densidad de siembra de $0,67 \times 10^6$ células por pocillo. Sobre el receptor de las células, los medios se cambiaron y las células se mantuvieron durante toda una noche en un incubador humidificado, abastecido con CO_2 . 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 su uso. Durante el periodo de tratamiento, las células se inspeccionaron visualmente a diario; se documentaron morfología celular, confluencia, y signos de toxicidad debidos al artículo del ensayo siempre que fue necesario. Los cultivos celulares se trataron con 4 concentraciones (0,5, 2, 8, y 20 μ M 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 μ M), un inductor prototípico de CYP3A4, como el control positivo. Las células Fa2N-4 se expusieron a los artículos del ensayo durante un total de 3 días. El medio de cultivo se reemplazó diariamente con medio recién preparado que contenía los artículos del ensayo. 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 caliente antes de añadir el tampón de lisis celular (Qiagen, Valencia, CA).

Se examinó 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 la expresión del ARNm de CYP3A4 en hepatocitos humanos inmortalizados Fa2N-4. El tratamiento de los hepatocitos Fa2N-4 con rifampicina (10 μ M) durante 3 días causó un incremento significativo (12 veces) en la expresión del 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 la concentración en la expresión del ARNm de CYP3A4, alcanzando 2,6 veces por encima del control del vehículo a la concentración más alta ensayada (20 μ M). Esta magnitud de inducción fue equivalente a un 22 % de la respuesta de la inducción causada por la rifampicina, sugiriendo que (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida podía inducir moderadamente CYP3A4 a concentraciones mayores que 20 μ M. La inducción relativamente mínima de CYP3A4 ($\leq 2,0$ veces) se observó a concentraciones más bajas 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 de hígado 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 en microsomas de hígado se estudió bajo tres grupos de condiciones. Las mezclas de incubaciones para ser humano y perro (volumen total de 3 ml, contenido en disolvente orgánico de un 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 microsomal (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, realizada por triplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguido de incubación a 37 °C durante 50 minutos. Las alícuotas de las muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos y la reacción se interrumpió mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Las mezclas de incubación de macaco de Java y rata (volumen total de 3 ml, contenido en disolvente orgánico de un 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 microsomal (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, realizada por triplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguida por incubación a 37 °C durante 50 minutos. Las alícuotas de las muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos y la reacción se interrumpió mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Las mezclas de incubación de ratón y macaco de Java (volumen total de 3 ml, contenido en disolvente orgánico de un 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

μM), proteína microsomal (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, realizada por duplicado, se inició mediante la adición de NADPH seguida por incubación a 37 °C durante 40 minutos. Las alícuotas de las muestras (0,25 ml) se tomaron a 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos y la reacción se interrumpió mediante la adición de 3 volúmenes de acetonitrilo. Para todos los estudios, se analizaron las muestras inmediatamente mediante un procedimiento de LC/MS. La velocidad de desaparición parental se calculó a partir de las relaciones del área del pico de (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonyl]]-[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)sulfonyl]]-[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 de hígado 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 del metabolismo *in vitro* se determinó para (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonyl]]-[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)sulfonyl]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (1 μM) 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 ser humano, respectivamente. Cuando las velocidades de consumo de (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonyl]]-[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)sulfonyl]]-[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 se anticipa que (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonyl]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida es un compuesto de baja eliminación en el ser humano.

FARMACOLOGÍA IN VITRO

Ensayo de Unión de Presenilina

Se realizaron 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-propilsuccinamida (RE987, compuesto A [Seiffert, D. y col., "Presenilin-1 and -2 are molecular targets for γ-secretase inhibitors", *J. Biol. Chem.*, 275 (44): 34086-34091 (2000)]). Se realizaron 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 unía a la γ secretasa. 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 a partir de fibroblastos de tipo silvestre y con anulación génica PS-1/PS-2 mostraron que [³H] (R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida se unía específicamente a membranas de fibroblastos de tipo silvestre pero no a fibroblastos con anulación génica y que la señal específica experimentó competencia por inhibidores de γ secretasa 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 diversos inhibidores de γ secretasa. Estos resultados mostraron que el desplazamiento de la 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 la potencia de la γ secretasa según se midió usando tanto ensayos de unión de radioligandos previos como inhibición de la formación de Aβ en células cultivadas.

Las células THP-1 se cultivaron en cultivos de Spinner en RPMI 1640 que contenían L-glutamina (Life Technologies Inc.) y β-mercaptoetanol 10 μM a una densidad celular de 5 x 10⁵/ml. Las células se recogieron mediante centrifugación, y los sedimentos que contenían 2 x 10⁸ células, se congelaron rápidamente en hielo seco/etanol y se almacenaron a -70 °C antes de su uso. En el día del ensayo, las células se descongelaron a 2 x 10⁸ células por 10 ml de tampón de homogeneización que consistía en HEPES 50 mM a pH 7,0 conteniendo un cóctel inhibidor de proteasas de hidrócloruro de fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonyl 10⁴ μM, aprotinina 80 nM, leupeptina 2 μM, bestatina 4 μM, pepstatina A 1,5 μM, y E-64 1,4 μM (0,1 % de cóctel inhibidor de proteasa P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, 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 centrífuga Sorval RC5B. El sedimento resultante se volvió a suspender en tampón a 4 °C para producir una concentración total de proteínas de 5 mg/ml. Para su uso en el ensayo de unión, el homogeneizado celular se diluyó hasta una concentración de 300 μg/ml en tampón de ensayo que consistía en HEPES 50 mM a pH 7,0, CHAPSO al 0,1 %. Los ensayos se iniciaron en placas de 96 pocillos de polipropileno (Costar, Cambridge, MA) mediante la adición de 200 μl de homogeneizado celular a 50 μl de tampón de ensayo que contenía 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 final de DMSO fue de un 1 %. La separación de la unión a partir del radioligando libre fue mediante filtración en 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 a pH 7,0 a 4 °C y se midió la radioactividad usando un contador de centelleo líquido Wayac 1450 Microbeta (PerkinElmer, Boston, MA). Los

valores de K_i de los compuestos competidores se derivaron a través de la corrección de Cheng-Prusoff de los valores de CI_{50} calculados usando XLfit (IDBS, Guildford, Reino Unido).

El ensayo anterior de unión de radioligandos se usó para medir la afinidad de los compuestos al sitio objetivo de la presenilina del complejo de γ secretasa. (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 la 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 los experimentos múltiples produjo $K_i = 0,48 \text{ nM} \pm 0,24 \text{ nM}$ (media $\pm$ DS, $n = 8$).

Inhibición de la Formación de A β en Células Cultivadas

Se ensayaron compuestos para la inhibición de A β 40 o A β 42 en células usando clon 8.20 de H4 APP751 SWE, desarrollado en Bristol-Myers Squibb, una línea celular de neuroglioma H4 que expresa el mutante sueco de APP751 de forma estable. Las células se mantuvieron en fase logarítmica a través de un paso dos veces a la semana a una dilución de 1:20. Para las determinaciones de CI_{50} , se sembraron 30 μl de células ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en medios de DMEM que contenían BSA al 0,0125 % (Sigma A8412) directamente en placas de compuestos de 384 pocillos (Costar 3709) que contenían 0,1 μl de compuesto diluido en serie en DMSO. Después de la 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 μl de cada pocillo a una segunda placa de ensayo (Costar 3709) para las medidas que 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 las placas de ensayo. Para las medidas de A β 42, se mezclaron 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 del péptido A β (26D6, desarrollado en SIBIA/Bristol-Myers Squibb; conjugado a APC (Perkin Elmer)) y se añadieron 20 μl de la mezcla a cada pocillo de la placa celular cultivada produciendo una concentración final de 565 de 0,8 ng/pocillo y de 26D6 de 75 ng/pocillo. Para las medidas de A β 40, se mezclaron anticuerpos específicos para el neopéptido A β 40 (TSD, desarrollado en Bristol-Myers Squibb; conjugado al reactivo de Wallac (Perkin Elmer)) y 26D6 como se ha descrito anteriormente y se añadieron 20 μl de la mezcla a las alícuotas de 10 μl que se habían retirado previamente de la placa de células produciendo una concentración final de TSD de 1,6 ng/pocillo y de 26D6 de 17,5 ng/pocillo. Las placas de ensayo que contenían anticuerpos se cerraron herméticamente con lámina de aluminio y se incubaron durante una noche a 4 °C. La señal se determinó usando un contador Viewlux (Perkin Elmer) y se determinaron los valores de CI_{50} usando ajuste de curvas en CurveMaster (basado en Excel Fit).

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

Inhibición de la Señalización Notch en Células Cultivadas

La actividad de γ secretasa se necesita para la señalización mediante la familia Notch de receptores transmembrana. Dado que la inhibición de la señalización Notch causa efectos secundarios basados en mecanismos, no deseados, se usó un ensayo celular para señalización Notch1- ΔE para realizar una prueba inversa de inhibidores de γ secretasa.

Una construcción de la expresión de Notch1 de ratón se generó mediante PCR usando técnicas estándar de biología molecular y se verificó mediante secuenciación. Esta construcción se generó en el vector de pCDNA3,1 + Hyg (Invitrogen) modificado para contener una secuencia de la señal N-Terminal de 20 aminoácidos y una marca de myc 7X C-terminal. La secuencia de la señal tuvo su origen en 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 de Notch1- ΔE de ratón contiene la secuencia de la señal Notch1 de ratón y la mutación M1727V dentro del dominio transmembrana para suprimir la iniciación de la traducción interna. La secuencia que codifica Notch1- ΔE de ratón a partir de la secuencia de los 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 de la señal en forma de un fragmento de XbaI/HindIII.

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 temporalmente usando TransIT-HelaMONSTER (Mirus) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se sembraron células Hela (ATCC) 16 horas antes de la transfección a una densidad de 4×10^6 células por matraz T 175 en medios de crecimiento de 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 Notch1- ΔE de ratón, 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 a CBF1 corriente arriba del promotor SV40 (Promotor pGL3, Promega). El indicador de luciferasa CBF1 se generó usando cebadores solapantes para generar la región de unión a CBF1 4X. Este fragmento se

subclonó dentro de los sitios NheI/BglII de las construcciones del 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 la transfección. Cinco o seis horas después de la adición de ADN, las células se eliminaron del matraz con Tripsina-EDTA y se volvieron a suspender en medios definidos (DMEM (glucosa alta con HEPES) con glutamina, penicilina, estreptomycin, albúmina de suero bovino 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 μ l/pocillo (1×10^4 células) y se incubaron a 37 °C durante 1,5 horas para permitir que las células se adhirieran a las placas. Los compuestos del ensayo se diluyeron inicialmente en una placa de polipropileno de 96 pocillos en DMSO al 100 %. Las disoluciones madre del compuesto de DMSO se diluyeron después 47,6 veces transfiriéndolas en una placa que contenía medios definidos produciendo una concentración de DMSO al 2,1 %. Las soluciones diluidas del compuesto (10 μ l) se añadieron a la placa de células produciendo una concentración final de DMSO de un 0,1 %. Las placas de células que contenían el compuesto se incubaron durante toda una noche a 37 °C. Después de esta incubación durante toda una noche, los medios se retiraron suavemente y se añadieron a cada pocillo 25 μ l de solución salina tamponada con fosfato (con calcio y magnesio). Los reactivos A y B de Luc-Screen (Applied Biosystems) se mezclaron en proporciones iguales y se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la mezcla. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de que el sustrato negro se uniera al fondo de la placa y la señal se leyó en un TopCount (Packard). Las curvas de respuesta a la concentración se ajustaron después usando regresión no lineal para determinar los valores de CI_{50} .

La actividad de la γ secretasa se necesita para la señalización mediante la familia Notch de receptores transmembrana. Dado que la inhibición de la señalización Notch causa efectos secundarios basados en mecanismos, no deseados, el ensayo celular para la señalización Notch1- ΔE que se describió anteriormente se usó para realizar una prueba inversa de inhibidores de γ secretasa. El análisis de los experimentos múltiples para la inhibición de la señalización Notch1- ΔE mediante (2R)-2-[[[4-(4-clorofenil)sulfonil][2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida produjo $CI_{50} = 58 \pm 23$ nM (media $\pm$ DS, n = 58).

En base a las potencias celulares para inhibir A β 40 (0,3 nM) y Notch (58 nM), la selectividad de Notch /APP para (2R)-2-[[[4-(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 A β

Las especies de A β a partir de animales se midieron usando ensayos de sandwich de ELISA. Se incluye aquí un breve análisis de estos ensayos dado que los epítomos para los anticuerpos individuales determinan las especies A β que se detectan. Los A β de ratón y de rata comparten una secuencia A β que difiere del A β de los seres humanos. Como resultado de estas diferencias en la secuencia, los anticuerpos que reconocen la región N-terminal del A β de seres humanos, tal como 26D6, se unen débilmente al A β de roedores. De forma análoga, los anticuerpos que se unen estrechamente al A β de roedores, tales como 252, se unen débilmente al A β de seres humanos. Se desarrollaron dos ensayos para medir A β 40 de roedores: 252-TSD y 4G8-TSD. El ensayo de TSD-4G8 puede medir no solamente A β 40, sino también otros productos de escisión de BACE- γ secretasa (A β 11-40) y productos de escisión de α secretasa- γ secretasa (P3). La Tabla I resume los ensayos presentados en la presente solicitud y su uso.

Tabla 1: Sumario de Pares de Anticuerpos Usados para Ensayar Muestras *In vivo*

Par de Anticuerpos	Tejidos analizados	Especies de A β detectadas
252 - TSD	Cerebro de rata	A β x-40 ^a
4G8-TSD	Plasma de rata, CSF	A β x-40 y P3
^a La localización exacta de "x" se desconoce. Mientras que 252 reconoce la región N-terminal de A β , se desconoce si el truncamiento amino terminal de A β afecta a la unión 252. Es improbable que esta incertidumbre sea un problema en ratas ya que el truncamiento N-terminal es raro.		

Cada uno de estos ensayos se validó usando diversos procedimientos. Primero, se añadieron cantidades variables de A β sintético a la matriz biológica y el incremento en la señal se comparó con el obtenido con A β sintético en solución tampón. Segundo, se agotó A β de la muestra biológica con anticuerpos anti-A β . Tercero, se ensayaron muestras de animales que se trataron con dosis altas de un inhibidor de γ secretasa. Un ensayo validado detectó de forma eficaz el A β añadido exógenamente (recuperación > 80 %), tuvo una señal muy reducida después del inmunoagotamiento de A β (reducción > 80 % comparada con controles no específicos), y tuvo una señal reducida a

valores que se aproximan o que se solapan con el valor de base del ensayo usando muestras de animales tratados con dosis altas de un inhibidor de γ secretasa. Los ensayos de A β optimizados y validados contenían aún una pequeña cantidad de la señal (de control de vehículo de un 5-20 %) que no se podría reducir mediante anticuerpos anti-A β o mediante tratamiento con inhibidores de γ secretasa. Es improbable que esta señal sea A β y se refiere en consecuencia al valor de base del ensayo. El valor de base del ensayo no se usó para corregir ninguna de las medidas de A β y en consecuencia, los valores indicados 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 en A β 42. A β 40 es un buen sustituto para A β 42 en los experimentos en células cultivadas en los que A β 40 y A β 42 fueron inhibidos 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 γ secretasa.

ESTUDIOS EN RATAS

En Vivo

Ratas hembra Harlan Sprague-Dawley (~ 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 por la mañana. Se prepararon soluciones de dosificación una vez al comienzo del estudio. Se usaron calentamiento a 56 °C y sonicación para solubilizar el compuesto en la solución de dosificación. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices de ACUC. Las muestras sanguíneas terminales se obtuvieron mediante punción cardiaca después de eutanasia con CO₂ y se recogieron en tubos de EDTA. El plasma se obtuvo después de la centrifugación. Se diseccionó tejido de cerebro, se pesó y se congeló en hielo seco hasta el análisis. Las muestras de CSF se centrifugaron para retirar células o restos antes de la disolución a 1:2 en BSA al 4 % y se congelaron para el análisis posterior. Las muestras histopatológicas se colocaron en formalina tamponada a pH neutro antes de su procesamiento. Las muestras que se recogieron para ocupación se recubrieron en matriz embebida, y se congelaron de -25 °C a -30 °C en un baño de 2-metilbutano seguido de hielo seco. Se obtuvieron muestras en plasma vivo usando sangrado retroorbital.

Ensayo A β 40 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 por centrifugación durante 30 minutos a 20.800 x g y el sobrenadante resultante se diluyó a 1:2 en PBS, BSA al 2,5 %. Se incubaron placas de ELISA Microlite II Blancas (Thermo Electron) con 50 μ g/ml de anticuerpo TSD9S3.2 en PBS durante 1 hora a 37 °C. Las placas se bloquearon con 200 μ l de albúmina en suero bovino al 5 % (BSA; en peso/volumen 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 anteriormente y después se incubaron con anticuerpo 252 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Biosource) diluido a 1:2000 en PBS, Tween al 0,05 %, BSA al 0,1 % durante 1 hora. Tres replicados contenían solamente el anticuerpo 252-HRP y tres replicados contenían el anticuerpo 252-HRP con 1 μ g/ml de A β 1-14 de rata (Anaspec) que compitió específicamente con el anticuerpo unido; esta señal de fondo se sustrajo a partir de la señal total para producir 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 de cerebro 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 μ g/g de tejido.

Ensayo A β 40 de Plasma

Se revistieron placas con anticuerpo TSD y se lavaron como para el ensayo de A β 40 de cerebro. Las muestras de plasma se diluyeron a 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 a 1:8000 en PBS, Tween al 0,05 %, BSA al 0,1 % durante 1 hora. Tres replicados tenían solamente el anticuerpo de 4G8-biotina y tres replicados tenían el anticuerpo de 4G8-biotina con 1 μ g/ml de A β 17-24 que competía con la señal específica y por lo tanto se estableció un valor de fondo para cada muestra. Después de lavar como anteriormente, las placas se incubaron con estreptavidina-HRP (Zymed) diluido a 1:50.000 en PBS, Tween al 0,05 %, BSA al 0,1 % durante 10 minutos. La detección y la cuantificación fueron como para los 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/ml de plasma.

Ensayo A β 40 de CSF

Se revistieron placas con anticuerpo TSD y se lavaron como para el ensayo de A β 40 de cerebro. Las muestras de CSF se diluyeron a 1:10 en PBS, pH 7,8, Tween-20 al 0,1 %. En el momento de la recogida, CSF se diluyó previamente a 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)

diluido a 1:8000 en PBS, Tween al 0,05 %, BSA al 0,1 % durante 1 hora. Debido a que el fondo era bajo, no fue necesario cargar las muestras de forma replicada con un péptido que compitiera para este ensayo. Se detectó y se 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 del Sitio de Gamma Secretasa

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 μ m, y se congelaron a -20 °C hasta su uso. 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 que contenía [³H] IN973 1,5 nM (Goldstein, M.E. y col., J. Pharmacol. Exp. Ther., 323: 102-108 (2007)) 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 la unión no específica, secciones adyacentes se incubaron en tampón que contenía [³H] IN973 o [³H] (R)-4-((N-(1-amino-4-metil-1-oxopentan-2-il)-4-clorofenilsulfonamido)metil)-N-(2-metoxietil)benzamida, pero que incluía inhibidor de γ secretasa no marcado a 0,5 μ M. 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 se secaron con un ventilador que soplabla aire frío. Los portaobjetos se situaron bajo pantallas de almacenamiento de fósforo sensibles al 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). Se midieron las densidades ópticas (expresadas como unidades de luz digitales por milímetro cuadrado) sobre las áreas de interés y se expresaron como un porcentaje del vehículo de control.

Procedimientos de Histopatología

Después de la eutanasia por asfixia con CO₂, se retiraron secciones de aproximadamente 3 cm de longitud del duodeno proximal del abdomen, se aclararon con solución salina tamponada con Fosfato enfriado con hielo y se colocaron en formalina tamponada al 10 % antes de seccionar. Las secciones de tejido del duodeno se embebieron en parafina líquida, se montaron sobre bloques, y se cortaron por triplicado en secciones de anillos sagitales (luminales cruzadas) y se tiñeron usando el procedimiento de base de ácido Peryódico de Schiff antes de la evaluación microscópica. Todos los animales sobrevivieron hasta que se realizó la autopsia.

Estudios Agudos en Ratas

Una sola dosis 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 el A β 40 de plasma como el A β 40 de cerebro a niveles de un 2 % y de un 16 % del vehículo de control, respectivamente. Para investigar adicionalmente el efecto de la (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 sola dosis 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 los tejidos después de las medidas de ocupación del sitio después de 2, 5, 8, 12, y 24 horas para el A β 40 de plasma, A β 40 de cerebro y γ secretasa. Estas medidas mostraron que 10 mg/kg y 100 mg/kg reducían el A β 40 de plasma y el A β 40 de cerebro a menos de un 25 % de los valores del A β 40 de la medida inicial de 2 a 24 horas después de la dosificación. En contraste, 1 mg/kg no causó un cambio estadísticamente significativo en el A β 40 de cerebro, pero en su lugar causó un aumento transitorio en el A β 40 plasmático. En particular, el A β 40 plasmático se incrementó en un 250 % de los valores de partida hacia 8 horas antes de volver a los valores de la medida inicial a las 24 horas. La ocupación de sitio de la γ secretasa mostró que más de un 94 % de los sitios de unión del inhibidor de la γ secretasa 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 en el punto temporal a las 24 horas (88 %) tras la dosis de 10 mg/kg. En contraste, sólo un 75 % de los sitios de unión de la γ secretasa de cerebro estaban ocupados 2 horas después de la dosis de 1 mg/kg y la ocupación del sitio volvió gradualmente a valores de la medida inicial a las 24 horas.

Los resultados de los 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 el A β 40 de plasma, el A β 40 de cerebro, y el A β 40 de CSF con una DE₅₀ entre 1 mg/kg y 10 mg/kg.

Estudios Subcrónicos en Ratas

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 anterior, las ratas se administraron con dosis diarias de 3, 10, 30 o 100 mg/kg/día. Los animales se sometieron a eutanasia 12 o 24 horas después de la tercera dosis o 5 horas después de la cuarta dosis. Las reducciones del área bajo la curva (ABC) del A β 40 de cerebro se estimaron mediante extrapolación lineal de los valores obtenidos a partir de los animales después de 5, 12, o 24 horas de la dosificación con el mismo grupo de dosis como se muestra en la Tabla 2. En base a estos

análisis, las reducciones del ABC del A β 40 dieron como promedio un 53 % a 3 mg/kg/día y se incrementaron a más de un 85 % a dosis de 10 mg/kg/día o superiores. Los niveles de los compuestos se midieron a varios tiempos para estimar los valores del ABC del compuesto (0-24 horas) al comienzo y al final del experimento. Estos valores mostraron que las exposiciones al compuesto después de 3 dosis estaban dentro de 2 veces de las exposiciones después de la dosis inicial. La evaluación histológica del tejido duodenal a partir de estas ratas mostró que 1/3 de las ratas dosificadas con 100 mg/kg/día presentaban lesiones leves.

Tabla 2: Sumario de Resultados a partir de Estudios en Ratas de 4 días

Estudio	Dosis (mg/kg/día)	Plasma (ng•h/ml) en el ABC del compuesto PK (uM•h)		A β 40 de Cerebro Terminal (% de Veh) ^a			Cerebro ^d % de Reducción del ABC de A β	Tox GI
		Día 1 ^c	Fin ^a	5 h	12 h	24 h		
Nº 1	3	10 5200	12 6240	39 %	35 %	92 %	49 %	NAD
(N = 3)	10	60 31200	48 24960	12 %	9 %	28 %	85 %	NAD
	30	169 87880	93 48360	8 %	9 %	13 %	90 %	NAD
Nº 2	3	10 5200	13 6760	16 %	34 %	94 %	57 %	NAD
(N = 3)	10	65 33800	55 28600	6 %	4 %	23 %	91 %	NAD
	30	191 99320	116 60320	6 %	4 %	15 %	93 %	NAD
	100	328 170560	199 103480	3 %	3 %	7 %	96 %	+e
^a Los valores representan niveles medios de A β 40 de cerebro para n = 3 animales expresados en relación al promedio del grupo de control del vehículo ^b Las reducciones del ABC de A β 40 de cerebro se estimaron mediante la extrapolación lineal de los valores obtenidos a partir de animales después de 5, 12 o 24 h de dosificación con el mismo grupo de dosis ^c Los valores representan el ABC (uM•h o ng•h/ml) a partir de n = 3 animales. Las ABC se estimaron a partir de las muestras tomadas a 5, 12, y 24 h después de la dosis 1 (Estudio Nº 1) o a partir de las muestras tomadas a 5, 12, 17, y 24 h después de la dosis 1 (Estudio Nº 2) ^d Los valores representan el ABC (uM•h o ng•h/ml) a partir de n = 3 animales. Las ABC se estimaron a partir de las muestras tomadas a 12 y 24 h después de la dosis 3 y 5 horas después de la dosis 4 (Estudio Nº 1) o a partir de las muestras tomadas a 12 y 17 y 24 horas después de la dosis 4 (Estudio Nº 2) ^e Metaplasia de las células caliciformes indicada en 1 de cada 3 animales. NAD = ninguna anomalía detectada								

Los resultados de los estudios subcrónicos en ratas 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 el A β 40 de cerebro sin toxicidad GI. En particular, una dosis de 3 mg/kg/día causó una reducción del ABC del A β 40 de cerebro de aproximadamente un 50 % comparada con una dosis de 100 mg/kg/día necesaria para inducir toxicidad GI.

La evaluación microscópica del duodeno proximal en un animal individual en el grupo de dosis altas (1 de cada 3 animales se evaluaron a este nivel de dosis) administrados con 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 al día durante 4 días reveló una ligera metaplasia de las células caliciformes en ese animal. No se indicó ningún cambio duodenal relacionado con fármacos en ratas administradas con (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonil]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida a $\leq$ 30 mg/kg.

En otro experimento, las ratas se dosificaron diariamente durante 4 o 7 días con 30 mg/kg/día o con 300 mg/kg/día (Tabla 3). Los niveles de A β 40 de cerebro en la terminación (5 horas después de la dosis) fueron de un 13 % del vehículo de control y de este modo similares a los estudios previos en ratas con (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonil]]-[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida. Los niveles en plasma del compuesto fueron similares 5 horas después de la primera y de la cuarta dosis. Algunas ratas en el grupo de dosis de 300 mg/kg/día (4 de 5) mostraron toxicidad GI después de 4 días de dosificación, pero ninguna de las ratas en los otros

grupos de tratamiento tenía toxicidad GI detectable, incluyendo los animales dosificados durante 7 días.

Tabla 3: Sumario de Resultados a partir del Estudio en Ratas N° 3

Dosis ^a (mg/kg/día)	Conc. de Plasma 5 h después de la dosis (uM)		Día 4	Conc. de Plasma 5 h después de la dosis (uM)		Día 7	
	Día 1	Día 4	Tox GI	Día 1	Día 7	Aβ40 de Cerebro a las 5 h (% de Veh)	Tox GI
30	5,9	5,6	NAD	7,2	6,2	13 %	NAD
300	12	10	+ ^b	14	11	13 %	NAD

^a N = se ensayaron 5 animales/grupo de dosis/punto temporal terminal (Día 4 o Día 7)

^b La metaplasia de las células caliciformes se observó en 4 de cada 5 animales.

NAD = ninguna anomalía detectada

Los resultados que se han mencionado anteriormente 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 potente y selectivo de la γ secretasa. Estos resultados apoyan 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 la enfermedad de Alzheimer, traumatismo craneal, lesión cerebral traumática, demencia pugilística, y/o otros trastornos asociados con el péptido β amiloide.

Los siguientes ejemplos se facilitan a modo de ilustración.

El compuesto de la presente solicitud se puede preparar en un número de formas bien conocidas por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. El compuesto de la presente solicitud se puede sintetizar usando los procedimientos que se describen a continuación, junto con los procedimientos sintéticos conocidos en la técnica de la química orgánica sintética, o variaciones en ella según lo observan los expertos en la materia. Los procedimientos preferentes incluyen los que se describen a continuación.

El compuesto se puede preparar usando las reacciones y las técnicas que se describen en esta sección. Las reacciones se realizan en disolventes apropiados para los reactivos y materiales usados y son adecuados para las transformaciones que se van a realizar. Además, en la descripción de los procedimientos sintéticos que se describen a continuación, se debe entender que todas las condiciones de reacción propuestas, incluyendo la elección del disolvente, atmósfera de reacción, temperatura de la reacción, duración del experimento y procedimientos de tratamiento, se eligen para que sean las condiciones estándar para esa reacción, que debería ser fácilmente reconocida por alguien experto en la materia. Alguien experto en la técnica de la síntesis orgánica entiende que la funcionalidad presente en diversas partes de la molécula debe ser compatible con los reactivos y las reacciones propuestas. Dichas restricciones a los sustituyentes que son compatibles con las condiciones de la reacción serán rápidamente evidentes para alguien experto en la materia y después se deben usar procedimientos alternativos.

Descripción de las realizaciones específicas

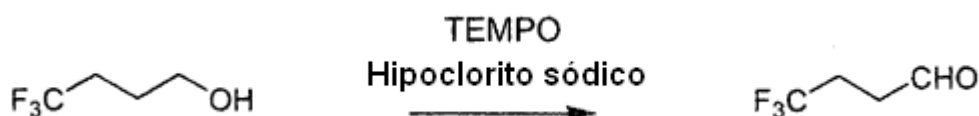
En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas se dan en grados centígrados. Los puntos de fusión se registraron en un aparato de punto de fusión por capilaridad Thomas Scientific Unimelt y no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética de protones (^1H RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 300, un Bruker Avance 400, o Bruker Avance 500. Todos los espectros se determinaron en los disolventes indicados y los desplazamientos químicos se indican en unidades δ por detrás del patrón interno de tetrametilsilano (TMS) y las constantes de acoplamiento de interprotones se indican en Hercios (Hz). Los patrones de multiplicidad se designan como sigue a continuación: s, singlete; d, duplete; t, triplete; c, cuadruplete; m, multiplete; a, pico ancho; dd, duplete de dupletes; d a, duplete ancho; dt: duplete de tripletes; s a, singlete ancho; dc, duplete de cuadruplete. Los espectros de infrarrojos (IR) se determinaron usando película de bromuro de potasio (KBr) o de cloruro sódico 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 indicaron en centímetros recíprocos (cm^{-1}). Las rotaciones ópticas $[\alpha]_D$ se determinaron en un polarímetro Rudolph Scientific Autopol IV en los disolventes indicados; las concentraciones se dan en mg/ml. Los espectros de masas (EM) de resolución baja y el peso molecular aparente (MH^+) o $(\text{M}-\text{H})^+$ 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 realizaron en un Shimadzu LC acoplado a un Water Micromass ZQ.

Se usan las siguientes abreviaturas: DMF (dimetilformamida); THF (tetrahidrofurano); DMSO (dimetilsulfóxido), Leu (leucina); TFA (ácido trifluoroacético); MTBE (metil *terc*-butil éter); DAST [trifluoruro de (dietilamino)azufre], HPLC (cromatografía líquida de alta presión); ta (temperatura ambiente); ac. (acuoso); PA (porcentaje de área).

Preparación A

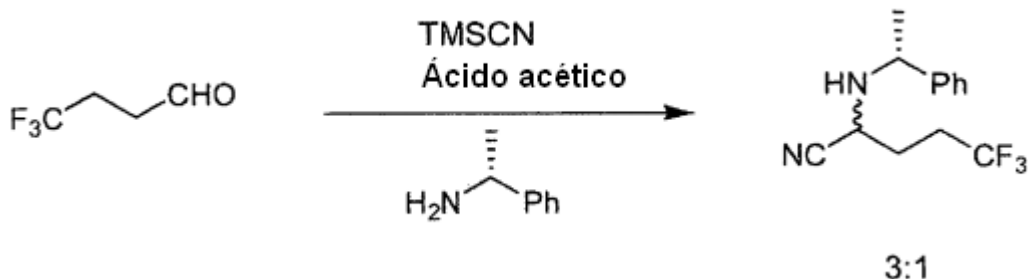
5 Hidrocloruro de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapas A. 4,4,4-Trifluorobutanal



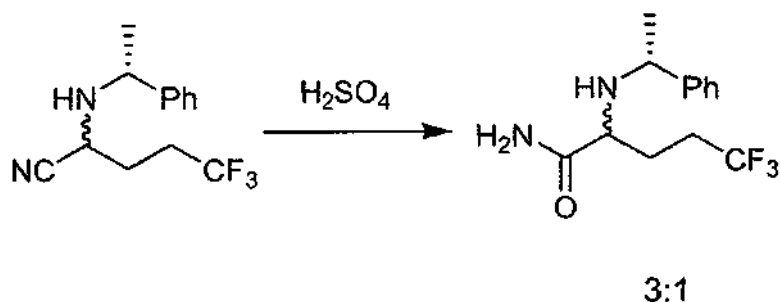
10 Diclorometano (4,2 l) se cargó en un matraz de fondo redondo de cuatro bocas de 20 l, equipado con agitación mecánica y baño de refrigeración. La agitación comenzó y la mezcla de reacción se enfrió de 0 a -2 °C. Se cargó 4,4,4-trifluorobutanol (750,0 g) y la mezcla de reacción se enfrió adicionalmente de -5 a -8 °C. Se añadió TEMPO; (2, 2, 6, 6-tetrametil-1-piperidiniloxi, radical libre) (9,15 g) mientras que la temperatura se mantenía entre -5 y -8 °C. Se añadió una solución acuosa de bromuro potásico (60 g en 1,17 l de agua) a la solución anterior y la temperatura se mantuvo de -5 a -8 °C. Una solución acuosa de NaOCl (8,8 l, 6-7 % en peso, tamponada a pH = 8,5 usando bicarbonato sódico) se añadió a la mezcla de reacción (advertencia: isotérmico) mientras que se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción a -5 °C. De forma análoga, peryodato sódico (NaIO₄) puede sustituir a NaOCl como el agente oxidante. Después de la 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 se secaron usando sulfato sódico anhidro. El agente secante se filtró, y la concentración de la solución de 4,4,4-trifluorobutanal se determinó por RMN. La solución que contenía el compuesto del título se usó directamente en la siguiente etapa sin procesamiento adicional. ¹H RMN (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).

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



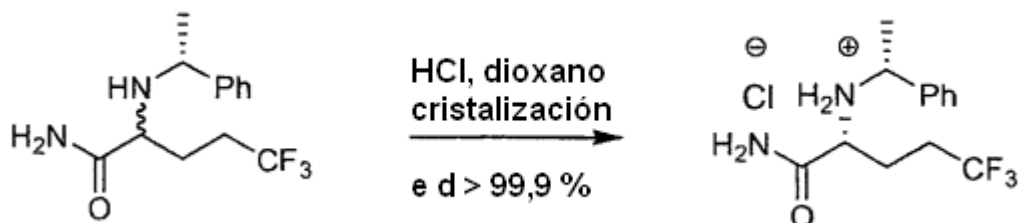
25 R-α-Metil bencilamina (528,5 g) se cargó en un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica, baño de refrigeración y se mantuvo bajo una manta de nitrógeno. Se cargó solución de 4,4,4-trifluorobutiraldehído (a partir de la Etapa A, 550 g), seguido de metanol (3,3 l). La mezcla de reacción se enfrió después de aproximadamente 0 a -3 °C. Se añadió ácido acético gota a gota (glacial, 260 ml), manteniendo la temperatura alrededor de 0 °C seguido de cianuro de trimetilsililo (581 ml) durante un periodo de 15 minutos. De forma análoga, se pueden usar cianuro sódico (NaCN) o cianuro potásico como la fuente de cianuro. La mezcla de reacción se calentó de 25 a 27 °C y se agitó durante una noche. La finalización de la reacción se determinó por 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) seguido de salmuera (1 x 5,0 l). La fase de diclorometano se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para producir el aminonitrilo del título (mezcla de diastereómeros) en forma de un líquido viscoso, con rendimiento medio de un 90 %. ¹H RMN (CDCl₃) (400 MHz) δ 1,42 (d y m, 5H), 2,15 y 2,35 (dos m, cada uno 1H), 3,10-3,20 (m, 1H), 4,10 - 4,15 (m, 1H), 7,10 - 7,35 (m, 6H).

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



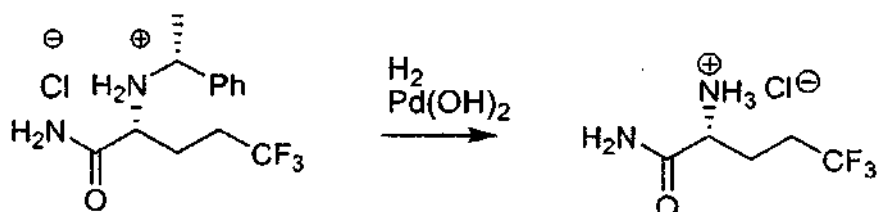
5,5,5-Trifluoro-2-(1-feniletilamino)pentanonitrilo (mezcla en bruto de los diastereómeros de la Etapa B, 1,10 kg) se disolvió en diclorometano (5,5 l) en un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica, baño de hielo para refrigeración y se mantuvo bajo una manta de nitrógeno. Se comenzó la agitación y la mezcla de reacción se enfrió de 0 a -5 °C. Se añadió ácido sulfúrico concentrado gota a gota (1,75 l) durante un periodo de 1 hora en la mezcla anterior, manteniendo la temperatura por debajo de 0 °C; se obtuvo una solución transparente después de completar la adición. La temperatura de la mezcla de reacción se elevó de 25 a 27 °C y se agitó durante una noche (12-14 h). La finalización de la reacción se determinó mediante HPLC. La mezcla de reacción se vertió lentamente sobre hielo triturado (~ 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 combinada de diclorometano se lavó con agua (1 x 12,0 l) seguido de salmuera (1 x 3,0 l). La fase orgánica rica en producto se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para producir 0,85 kg (72,0 %) del compuesto del título en bruto. ¹H RMN (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 uno de CONH₂ con picos menores para otro diastereómero), 7,20 - 7,40 (m, 6H, Ar + NH).

Etapla D. Hidrocloruro 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) en un recipiente adecuado equipado con agitación mecánica y baño de refrigeración. Se cargaron metanol (2,55 l), acetato de etilo (1,7 l) y agua (1,06 l) y la mezcla de reacción se enfrió de 0 a 5 °C. Se añadió una solución de HCl en dioxano (4,5 M, 1,72 l) gota a gota durante un periodo de 30 a 45 minutos. De forma análoga, se podrían usar como disolvente mezclas de isopropanol y metil *tert*-butil éter, y se podría usar HCl concentrado o acuoso como la fuente de HCl. La temperatura de la mezcla de reacción se elevó después de 25 a 27 °C y se agitó durante 2 horas. La finalización de la reacción se determinó por 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 de éter de petróleo (2,5 l), o con una mezcla de isopropanol y metil *tert*-butil éter. Se permitió que el sólido se secase a temperatura ambiente en una bandeja abierta, dando la R-amino amida del título (480 g, rendimiento de un 50 %, exceso diastereomérico = 99,9 %) ¹H RMN (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 (s a, 5H, Ar).

Etapla E. Hidrocloruro de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida



Se cargó con hidrocloreuro de (R)-5,5,5-trifluoro-2-((R)-1-feniletilamino)-pentanamida (1,50 kg) en un recipiente de presión adecuado, junto con metanol (15,0 l). Esto fue seguido de la adición de agua (701,0 ml) seguido de hidróxido de paladio al 20 % sobre carbono (225 g). De forma análoga, se podría usar paladio sobre carbono (Pd/C) como el catalizador de hidrogenación. El recipiente se lavó abundantemente con nitrógeno tres veces, y después se presurizó gas hidrógeno en el recipiente (3-4 kg/cm²) a 60 °C. La reacción se controló para la finalización mediante HPLC. Después de 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. Después, el filtrado se concentró a 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 45 °C durante 12 horas, dando el compuesto del título (915 g, 91,0 %; Pureza = 97 %). ¹H RMN (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 (s a, 1H, cada uno de CONH₂), 8,44 (s a, 3H, NH₃⁺). ¹³C RMN (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 mmoles), R,S-alanina (200 mg, 2,244 mmoles), y fosfato de piridoxal 0,02 mM, en tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, se incubó con la R-transaminasa AT-103 de Biocatalytics (5 mg, 44 unidades) o con la R-transaminasa clonada de *Bacillus thuringiensis* SC16569 (0,5 ml, 10 unidades, transaminasa de BMS) a 30 °C en un volumen total de 5 ml en tubos de 15 ml durante 44 h. Se tuvieron rendimientos de reacción del ácido (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico de un 49 % y un 48 % con las transaminasas AT-103 y BMS, respectivamente. El e. e. fue de un 100 % en ambos casos.

Los rendimientos se incrementaron añadiendo enzimas auxiliares para reducir el piruvato a lactato. La lactato deshidrogenasa necesita NADH como un cofactor. El NADH se regeneró usando formiato deshidrogenasa. Una solución que contenía ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (100 mg, 0,588 mmoles), D,L-alanina (200 mg, 2,244 mmoles), fosfato de piridoxal 0,02 mM, formiato sódico (68 mg, 1 mmol), NAD (3,31 mg, 5 μmoles) 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 clonada a partir de *Pichia pastoris* y expresada en *Escherichia coli*) en tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, se incubó con R-transaminasa AT-103 de Biocatalytics (5 mg, 44 unidades) o con 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 del ácido (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico de un 94 % y un 91 % con las transaminasas AT-103 y BMS, respectivamente. El e. e. fue de un 100 % en ambos casos.

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

Procedimiento 1: ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (60,00 g, 0,353 moles), NH₄Cl (64,19 g, 1,2 moles), glucosa (86,4 g, 0,479 moles) y agua (975 ml) se cargaron 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 para disolver los sólidos. El pH fue aproximadamente 7, se añadió Na₂CO₃ (12,72 g, 0,12 moles) que llevó 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 la 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 la adición de NaOH 5 N a partir de un pH establecido. Después de 21 h, el rendimiento de la solución de ácido (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico fue de 51,1 g, rendimiento de un 84,7 %, e. e. de un 100 %.

Procedimiento 2: ácido 5,5,5-trifluoro-2-oxopentanoico (60,00 g, 0,353 moles), NH₄Cl (64,19 g, 1,2 moles), glucosa (86,4 g, 0,479 moles) y agua (975 ml) se cargaron 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 para disolver los sólidos. El pH fue aproximadamente 7, se añadió Na₂CO₃ (12,72 g, 0,12 moles) que llevó 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 de contenía 1500 unidades, enzima de BMS). La mezcla de reacción se llevó a pH 9 mediante la 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 la adición de NaOH 5 N a partir de un pH establecido. Después de 15 h el rendimiento de la solución de ácido (R)-5,5,5-trifluoro-2-aminopentanoico fue de 51,04 g, rendimiento de un 84,6 %, e. e. de un 99,1 %.

Preparación C

4-(Bromometil)-3-fluorobenzonitrilo



Procedimiento A. Bromación con NBS/AIBN

- 5 Se cargó 1,2-dicloroetano (151 kg) a un recipiente adecuado junto con 4-ciano-2-fluorotolueno (24 kg) y AIBN (2 kg). La mezcla se calentó a 70~74 °C. Una vez que la temperatura de lote alcanzó 70 °C, se añadió N-bromosuccinimida (47,4 kg) en porciones a la velocidad de 12kg/h, manteniendo la temperatura a 70~74 °C (es importante controlar la velocidad de reacción para evitar la reacción exotérmica). La mezcla se muestreó por medio de detección de GC después de añadir 24 kg de N-bromosuccinimida, y la reacción se calentó a 70~74 °C hasta que se observó la
- 10 reacción completa. La mezcla se enfrió a 0-5 °C y se permitió que reposara 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 sódico (10,3 kg) durante 6 horas, se filtró y la torta se lavó con MTBE (24 kg). La solución se evaporó a presión reducida, se añadió etanol (12 kg) y la mezcla se calentó a 40-45 °C, después se enfrió lentamente a 0-5 °C mientras que se agitaba para cristalizar. La mezcla se filtró y la torta se lavó con etanol frío (5 kg). El sólido en bruto se recrystalizó a partir de éter de petróleo, se filtró y se lavó con éter de petróleo (10 kg), dando el compuesto del
- 15 título 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo en forma de un sólido de color blanquecino (21 kg, rendimiento de un 55 %). ¹H RMN (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, 1 H) 7,52 (dd, J = 7,91, 7,16 Hz, 1 H). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ ppm 23,65 (d, J = 4,60 Hz, 1 C) 113,76 (d, J = 9,77 Hz, 1 C) 117,09 (d, J = 2,87 Hz, 1 C) 119,44 (d, J = 24,71 Hz, 1 C) 128,44 (d, J = 4,02 Hz, 1 C) 130,66 - 130,81 (s, 1 C) 130,81 - 131,06 (s, 1 C) 132,18 (d, J = 3,45 Hz, 1 C) 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; Encontrado: C, 44,94; H, 2,73; N, 6,56; F, 8,73.
- 20

Procedimiento B. Bromación con bromato sódico

- 25 A un reactor adecuado se añadieron diclorometano (40 l) y 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo (4 kg, 18,7 mol) seguido de una solución de bromato sódico en agua (13,45 kg, 89,1 moles disueltos en 53,6 l de agua). La mezcla de reacción se enfrió a 0-5 °C. Se añadió una solución de bisulfito sódico (9,25 kg disueltos en 42 l agua) se durante un periodo de 2-3 horas mientras que la temperatura del lote se mantenía a 10-20 °C (la reacción es exotérmica). Después de completar la adición, una lámpara de 200 W se proyectó sobre el reactor y la temperatura del lote aumentó a 25-30 °C. La luz y la temperatura continuaron hasta que el producto fue de un 70-75 % mediante HPLC. La luz se retiró, la
- 30 agitación se detuvo y se permitió que la reacción se asentara 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 se lavaron cuatro veces con una solución de tiosulfato sódico al 10 %. La fase orgánica se lavó después con salmuera (10 l) y se secó con sulfato sódico. La fase orgánica se concentró y después se añadió éter de petróleo y se destiló a sequedad dos veces para retirar todo el diclorometano. Se añadió éter de petróleo (3 l) y la suspensión se enfrió a 5-10 °C durante
- 35 1 hora. La suspensión se filtró y se lavó con éter de petróleo frío. El producto se secó en un horno de vacío a 40-45 °C para dar el compuesto del título (3,2 kg, rendimiento de un 50,4 %) en forma de un sólido de color blanquecino.

- Procedimiento representativo para la recuperación del compuesto del título a partir de las aguas madre: La masa en bruto (~ un 36 % de 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo y ~ 59 % de *gem*-dibromuro) obtenida a partir de la concentración de las aguas madre (300 g) y 2 equivalentes de diisopropil etil amina (en base a *gem*-dibromuro) se
- 40 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 min a 0-5 °C y se controló por TLC. Cuando ya no había dibromuro presente por TLC, se añadió agua (3,3 l) y la suspensión resultante se filtró. La torta de filtro se lavó con agua y se secó en un horno de vacío (hasta que el contenido de humedad fue < 1 %) para dar 202 g (98 AP mediante HPLC) del compuesto del título adicional.

45 Preparación D

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

A un recipiente adecuado equipado con agitador mecánico en atmósfera de N₂ se cargaron 202,0 g de 3-fluoro-4-metilbenzonitrilo seguido de 1,0 l de etanol. Se añadió hidroxilamina (144 ml de solución al 50 % en agua) mediante un embudo de adición durante 20 minutos. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que el análisis

mediante HPLC mostró que la reacción era completa (no quedaba material de partida). Se añadió agua (3,0 l) gota a gota a la solución de color amarillo pálido durante 1 hora para dar una suspensión espesa. La suspensión se enfrió en un baño de agua con hielo a 2 °C durante 1,5 horas, se filtró y se secó al vacío a 35 °C durante 22 horas para dar el compuesto del título (230,3 g, 91,6 %) en forma de un sólido de color blanco. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,30 (m, 2H), 7,19 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 2,28 (s, 3H); ¹³C RMN (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; ¹⁹F RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ -116,35, -116,37, -116,39. LC-MS M+H 169,19.

Preparación E

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

10 Procedimiento A. Trifluoruro de boro

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

20 Procedimiento B. Ácido trifluoroacético

Un recipiente adecuado equipado con un agitador mecánico en una atmósfera de N₂ se cargó con 3-fluoro-N'-hidroxi-4-metilbenzoimidamida (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 un periodo adicional de 90 minutos, 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 al vacío a 50 °C durante 12 horas para dar 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol en forma de un sólido de color blanco (306 g, 95,6 %). HPLC indicó una pureza química de un 99,8 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,67 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,23 (t, J = 8 Hz, 1H), 2,28 (s, 3H); ¹³C RMN (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, ¹⁹F RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ -115,94, -115,96. Análisis Calculado para C₉H₇N₂O: C, 60,67; H, 3,96; N, 15,72. Encontrado: 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 en etapas

35 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 en atmósfera de nitrógeno, se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (50 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró en un rotavapor para dar 3-(4-(dibromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol, (9,34 g, 93 %) en forma de un sólido de color blanco que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Un matraz de fondo redondo de 200 ml se cargó 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 diisopropil etilamina (3,48 g, 27 mmol) durante 15 minutos, seguido de fosfito de dietilo (3,7 g, 26,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se inactivó con 40 ml de agua. La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 40 ml). La fase orgánica combinada se lavó con 20 ml de NH₄Cl ac. sat y con 20 ml de una solución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró en un rotavapor para dar un sólido en bruto que se purificó mediante un lecho de sílice corto para proporcionar 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (6,03 g, 94 %). p.f. 87,3 °C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,80 (s, 1H), 7,94 (dd, 1H), 7,87 (dd, 1H), 7,58 (t, 1H), 4,57 (s, 2H); ¹³C RMN (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; ¹⁹F RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ -115,81, -115,84, -115,86. Análisis Calculado para C₉H₆BrFN₂O: C, 42,05; H, 2,35; N, 10,90. Encontrado: C, 42,17; H, 2,17; N, 10,63.

Procedimiento B. Bromación alternativa en un solo recipiente

55 3-(3-Fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (101,8 g, 0,57 mol) y N-bromosuccinimida (206 g, 1,16 mol) se disolvieron 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 HPLC mostró una conversión completa del material de partida a una

mezcla del monobromuro y de dibromuro. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió diisopropil etilamina (73 ml, 54,2 g, 0,42 mol) mientras que se mantenía 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, HPLC mostró la conversión completa del dibromuro en el monobromuro. Se añadió agua (1,2 l) y el precipitado resultante se filtró. El lavado con agua (2 x 200 ml) y el secado proporcionaron 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (135 g, rendimiento de un 92 %).

Procedimiento C: Bromación con bromato sódico (aislamiento directo)

Bromato sódico (2,54 g) se disolvió 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 ta. Una solución de NaHSO₃ (1,75 g) en agua (17 ml) se añadió gota a gota (PRECAUCIÓN: EXOTÉRMICO). La mezcla se agitó a ta durante 2 h, y después se mantuvo en una habitación fría durante una noche. La fase de 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 ta durante 3h, 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 AP. Recuperación de la segunda cosecha: el filtrado se concentró hasta un volumen de ~ 30 ml y la suspensión resultante se filtró para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco 0,23 (16 %) con HPLC 97,09 AP.

Procedimiento D: Bromación con bromato sódico (procedimiento en dos etapas usando reducción de dibromuro)

Una solución de 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol (20,0 g, 112,2 mmol) en diclorometano (200 ml) se añadió a una solución de NaBrO₃ (50,8 g, 336,7 mmol) en agua (200 ml) a ta. La mezcla de las dos fases resultantes se enfrió a 0 °C. La solución de NaHSO₃ (35,7 g, 336,7 mmol) en agua (160 ml) se añadió gota a gota para mantener la temperatura del lote por debajo de 20 °C (~ 1 h). La solución resultante de color rojo se agitó a ta hasta que 3-(3-fluoro-4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol estuvo por debajo de 1,0 AP 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 una solución acuosa de Na₂S₂O₃ al 10 % (200 ml), agua (200 ml) y salmuera al 15 % (200 ml). Se obtuvo un sólido de color blanco (una mezcla de monobromuro y dibromuro) después de concentración al vacío. Este sólido se disolvió en MeCN húmedo (200 ml, KF: 1,5-4 %), y la solución se enfrió de -5 °C a 0 °C. Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (6,0 g, 8,1 ml, 46,4 mmol), seguido de la adición gota a gota de fosfito de dietilo (6,0 g, 46,1 mmol) durante 15 minutos. La mezcla se agitó de -5 °C a 0 °C hasta que 3-(4-(dibromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol fue < 0,5 AP (1,5-2 h). Se añadió agua (500 ml) durante 30 min, dando como resultado una suspensión de color blanco. Esta suspensión se agitó a ta durante 1-3 h, y después se filtró. La torta se lavó con agua (2 X 200 ml), y después se secó al 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. Encontrado: C, 42,10; H, 2,24; N, 10,90; Br, 31,18; F, 7,00.

Ejemplo 1

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

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

A una solución de (R)-fenetilamina (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 al vacío para proporcionar el compuesto del título de aminonitrilo (18,1 g, 89 %, en forma de una mezcla 4:1 de diastereómeros) en forma de un aceite de color amarillo pálido: ¹H RMN (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 MS m/z 257 [C₁₃H₁₅F₃N₂ + H].

Etapa B. Hidrocloruro 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 diastereoisómeros) en CH₂Cl₂ (100 ml) se añadió H₂SO₄ (100 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 22 h, se vertió sobre hielo triturado y se neutralizó con NH₄OH. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 500 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para proporcionar la base libre del compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros (18,94 g, 98 %) en forma de un aceite de color naranja: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,18 (m, 5H), 6,78 (s a, 0,23H), 6,50 (s a, 0,77H), 6,00 (s a, 0,77H), 5,81 (s a, 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); ESI MS m/z 275 [C₁₃H₁₇F₃N₂O + H].

Sal de Hidrocloruro

A una solución de la base libre del compuesto del título en forma de una mezcla de diastereómeros (11,9 g, 43,4 mmol) en Et₂O/ MeOH (7:1, 40 ml) se añadió una solución de HCl 1 N en Et₂O (70 ml). El precipitado de color blanco formado se volvió a disolver mediante calentamiento de la mezcla y añadiendo MeOH (hasta una relación final 4:1 de Et₂O/MeOH). La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se dejó que reposara durante una noche. La sal de hidrocloruro de aminoamida del compuesto del título se aisló en forma de un solo diastereómero (3,11 g, 23 %) en forma de un sólido de color blanco: ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7,93 (s a, 1H), 7,69 (s a, 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); ESI MS m/z 275 [C₁₃H₁₇F₃N₂O + H].

Etapa C. (R)-2-(4-Clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida

A una solución de hidrocloruro de (R)-5,5,5-trifluoro-2-((R)-1-feniletilamino)pentanamida (3,10 g, 10,0 mmol) en EtOH (100 ml) se añadió Pd(OH)₂ (350 mg) y agua (10 ml). La mezcla de reacción se hidrogenó (276 kPa) durante 4 h a 50 °C. La reacción se filtró a través de CELITE® y el filtrado se concentró al vacío para producir el compuesto intermedio de hidrocloruro de amina en forma de un sólido de color blanco. A una suspensión de la amina en CH₂Cl₂ (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 NaHCO₃ (250 ml) y salmuera (250 ml), se secó sobre Na₂SO₄, y se concentró al vacío. El compuesto del título (2,91 g, 84 %) se obtuvo en forma de un sólido de color blanco mediante la trituración del residuo con CH₂Cl₂/hexanos (2:1): ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) 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); ESI MS m/z 345 [C₁₁H₁₂ClF₃N₂O₃S + H].

Etapa D. (R)-2-(4-Cloro-N-(2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)bencil)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 Cs₂CO₃ (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 x 50 ml). El extracto orgánico combinado se lavó con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, EtOAc/hexanos al 0-55 %) para proporcionar el compuesto de oxadiazol del título (92 mg, 45 %) en forma de un sólido de color blanco: p.f. 66-68 °C; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) 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); ESI MS m/z 521 [C₂₀H₁₇ClF₄N₄O₄S + H]⁺; HPLC 98,9 % (ABC), t_R = 19,4 min.

Ejemplo 2

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

Etapa 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 añadieron N-bromosuccinimida (4,97 g, 0,28 mol) y AIBN (100 mg, 0,61 mmol) y la mezcla se calentó 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 retiraron al vacío para producir 5,44 g del compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino. ¹H RMN indicó la presencia de un 20 % de material de partida. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) para el compuesto del título: δ 7,54-7,30 (m, 3H), 4,83 (s, 2H).

Etapa 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 Cs₂CO₃ 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 Na₂SO₄. El producto se purificó por Biotage (columna 40+M, EtOAc de un 3 % a un 80 % en hexanos, 651 ml). El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (6,50 g, rendimiento de un 68,1 %). ¹H RMN (DMSO-d₆, 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). LC/MS M+H 478,14, 94 %.

Etapa C. (2R)-2-[[[4-Clorofenil]sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]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 NH₂OH (50 % en H₂O, 2,6 ml, 40,8 mmol). La mezcla resultante se agitó a 80 °C en atmósfera de nitrógeno durante 1 h y después se enfrió a ta. Los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavaron con agua y se secaron sobre Na₂SO₄. La evaporación del disolvente dio un sólido de color blanco que se recrystalizó en EtOAc y hexanos para producir la oxima de amida intermedia en

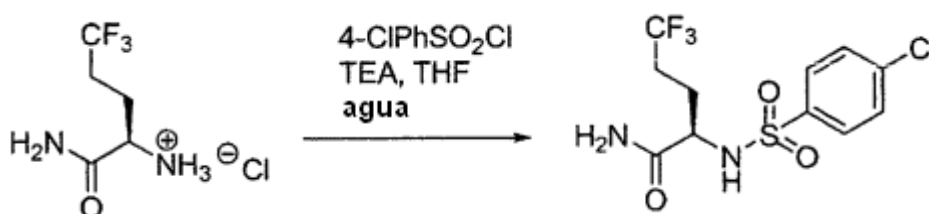
forma de un sólido de color blanco (6,93 g, rendimiento cuantitativo). A una mezcla de la (R)-2-(4-cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxycarbamidooil)encil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida intermedia (6,93 g, 13,6 mmol) y ortoformiato de trietilo (6,77 ml, 40,8 mmol) en dicloroetano (30 ml) se añadió $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (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 de un 3 % a un 80 % en hexanos, 651 ml) proporcionó el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco. (4,9 g, rendimiento de un 69,3 %).

Los 4,9 g anteriores 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 que se ha descrito en el Ejemplo 1). A los lotes combinados (14,7 g) se añadió alcohol isopropílico (75 ml). La mezcla se calentó a reflujo hasta la disolución casi completa, y después se filtró. El filtrado se agitó a ta durante 16 h. y se filtró. Se obtuvo un sólido de color blanco cristalino fino blanco después de secar hasta masa constante para proporcionar (2R)-2-[[[4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (13,7 g). ^1H RMN (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); ESI MS m/z 521 [$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClF}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{S} + \text{H}$] $^+$.

Ejemplo 3

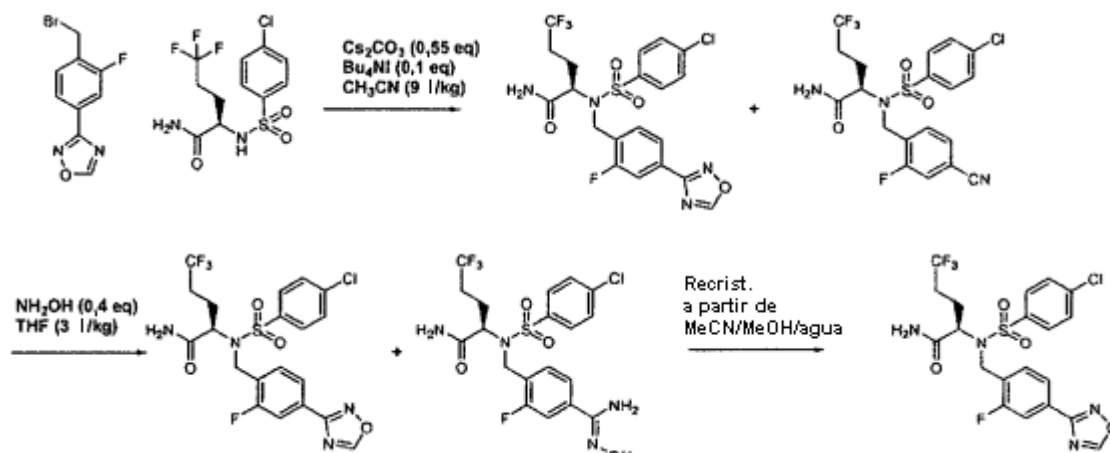
(2R)-2-[[[4-Clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapas A. (R)-2-(4-Clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida



A un recipiente seco adecuado se añadió hidrocloreto de (R)-2-amino-5,5,5-trifluoropentanamida (199,52 g 0,966 mol, 1,0 equiv.) seguido de cloruro de 4-clorobencenosulfonilo (215,22 g, 0,989 mol, 1,02 equiv, 97 % en % en 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- 25 °C, y la suspensión resultante de color blanco se agitó a 15-25 °C durante 30 min. Se añadió agua (1,4 l, 7 vol) a la mezcla de reacción a 20-25 °C y después se retiró THF (1,4 l, 7 vol) por destilación al vacío (la temperatura del recipiente se mantuvo a 40-60 °C a 33-53 kPa durante el procedimiento de destilación). Cuando se completó el procedimiento de destilación, se añadieron 1,4 l (7 vol) de agua durante 30 min mientras que se mantenía la temperatura del recipiente a 50-60 °C, y la suspensión resultante se agitó a 50-60 °C durante 30 min y después enfrió a 10 °C. La suspensión se agitó durante no menos de 1 hora, y el producto se filtró. La torta de filtro se lavó con agua (600 ml cada lavado) hasta que el pH del lavado de la torta midió ≥ 5 . La torta se secó al vacío a no más de 70 °C (temp. de la camisa) hasta que la pérdida en el secado es < 0,5 % en p/p, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (300 g, rendimiento de un 91 %.) ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) (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, - (CONH_2)CH(NH), 7,13 y 7,37 (s a, 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). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) (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.

Etapa B. (2R)-2-[[[(4-Clorofenil)sulfonyl][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida



Etapa B, Procedimiento 1.

Un recipiente adecuado se cargó 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 mmoles), y acetonitrilo (9 ml/g; 5,4 l). La camisa se calentó a 40 °C (38 °C internos). La reacción se controló mediante HPLC hasta que (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue < 5 AP. 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 recipiente y se agitó para facilitar la transferencia del sólido adherido al agitador y a las paredes del recipiente. La torta en bruto se lavó una vez con el agua usada para aclarar el reactor. La torta en bruto se secó en bandejas al 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 de 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 controló mediante HPLC hasta que (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue < 0,4 AP. 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) mientras se agitaba y la reacción se hizo oleaginosa, después precipitó. Se permitió que la suspensión reposara 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 al vacío a 40-50 °C y se pesaron 613 g después del secado hasta una pérdida en el secado < 1 %. El producto en bruto se volvió a transferir al recipiente junto con MeOH (3,678 l) y MeCN (1,226 l). La camisa se calentó a 60 °C (52 °C internos) para realizar la disolución completa, y se añadió lentamente agua (2,023 l) a esa temperatura, manteniendo una temperatura interna de > 50 °C. Cuando la adición de agua fue completa, la solución se enfrió a una temperatura interna de 15 °C durante 4 horas mientras se producía la cristalización. Se cargó agua adicional al reactor (400 ml) y la reacción se filtró y las aguas madre se devolvieron al recipiente. Las aguas madre se agitaron durante 2 minutos para liberar cualquier producto adherido en el recipiente. La torta en bruto se lavó con aguas madre seguido de heptanos (1,500 l). El producto se secó en bandeja al vacío a 40-50 °C hasta que la pérdida en el secado fue < 0,5 % para dar (2R)-2-[[[(4-Clorofenil)sulfonyl][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida en forma de un sólido de color blanquecino, brillante (577,6 g, rendimiento de un 63,76 %).

Etapa B, Procedimiento 2.

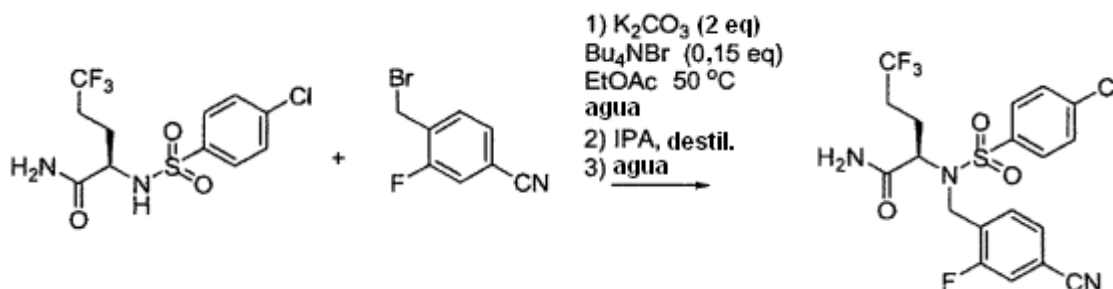
A un recipiente adecuado se añadió (R)-2-(4-clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (2,68 kg, 7,77 mol, 1 equiv.), 3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol (2,00 kg, 7,78 mol, 1 equiv.), carbonato de cesio (1,65 kg, 5,06 mol, 0,65 equiv.), yoduro de tetrabutylamonio (0,29 kg, 0,78 mol, 0,1 equiv.) y acetonitrilo (12,0 l, 4,5 l/kg). La reacción se calentó a 35 °C hasta completar la reacción mediante HPLC (3-(4-(bromometil)-3-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol < 0,5 del PA relativo mediante HPLC). La reacción se enfrió a 15 °C. y se añadió agua (10,72 l, 4 l/kg) con agitación seguido de ácido acético glacial (0,22 kg) para llevar 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 de solución de salmuera (20 % en 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 al vacío (20 kPa) hasta que se retiró el acetonitrilo. La concentración se ajustó con tolueno adicional cuando fue necesario después de la destilación para asegurar que el volumen total en el reactor era ~10 l/kg. Se cargó alcohol isopropílico (0,48 kg, 0,2 l/kg) y el lote se enfrió a 15 °C para iniciar la 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 en el secado fue < 1,0 %.

La torta seca se añadió a un reactor de 100 l 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 equiv.). La mezcla se calentó a 65 °C y se controló mediante HPLC hasta que (R)-2-(4-cloro-N-(4-ciano-2-fluorobencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida fue < 0,4 del PA. La reacción se destiló después (temperatura del recipiente ~ 50 °C, vacío de 30 kPa) 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 elevó a 70 °C para conseguir la disolución completa. Se cargó agua (11,26 l, 4,2 l/kg) lentamente mientras que se mantenía la temperatura de reacción > 65 °C. La reacción se enfrió a 15 °C durante 2 horas y se produjo cristalización. La suspensión se filtró y se lavó con alcohol isopropílico acuoso frío (IPA:agua a 2:1 en volumen). La torta se secó en un horno de vacío hasta que la pérdida en el secado fue < 1 %. El producto se recrystalizó después disolviendo en acetonitrilo (2 l/kg en base al peso de introducción de la 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 se lavó con una solución de metanol:acetonitrilo:agua (6:2:4, 5 l/kg) para dar (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 de un 50 %) en forma de un sólido de color blanco.

Ejemplo 4

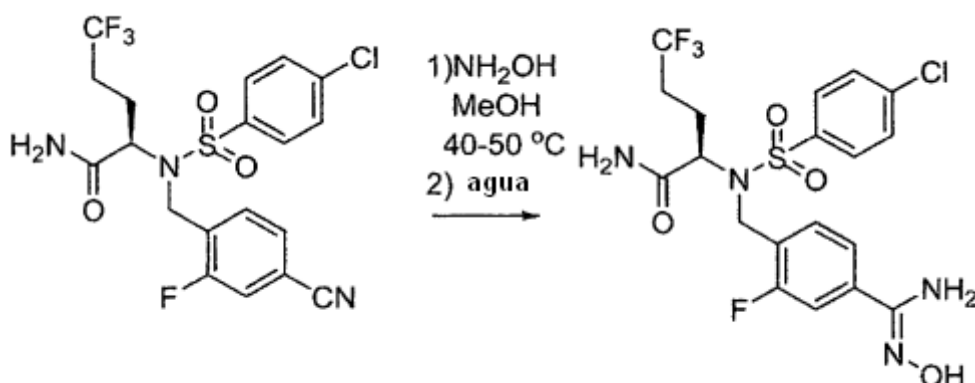
(2R)-2-[[[4-Clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida

Etapas A. (2R)-2-[[[4-Clorofenil)sulfonil][[4-ciano-2-fluorofenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida



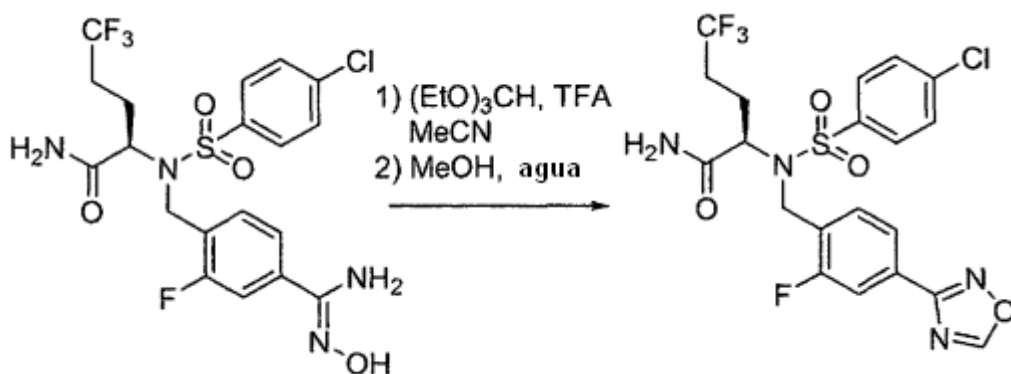
(R)-2-(4-Clorofenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (3,444 kg), carbonato potásico (2,774 kg), bromuro de tetrabutilamonio (0,484 kg), y 4-(bromometil)-3-fluorobenzonitrilo (2,092 kg) se cargaron a un reactor. Después se cargaron acetato de etilo (17,2 l) y agua (3,44 l) y el lote se calentó a 50 °C hasta que se completó mediante HPLC (material de partida del PA relativo < 1). 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 se separó la fase acuosa. Se cargó una solución de fosfato sódico monobásico (0,2 M en agua, 20,66 l) la fase acuosa del fondo se separó y el pH se ensayó para asegurar que era < 6,5. (Nota: Si el pH es > 6,5, se pueden cargar 20,66 l adicionales de una solución monobásica de fosfato sódico 0,2 M y la extracción y la medida de pH se repitieron.) El disolvente se intercambió después mediante una destilación a vacío a volumen constante. El reactor se colocó a vacío (36 kPa) y la camisa se calentó a 75-80 °C. Una vez que comenzó la destilación del 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 que se añadió todo el isopropanol, el vacío se liberó y se cargó 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 al vacío a 50 °C para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (3,648 kg, rendimiento de un 78 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO- d₆) δ ppm 1,42 - 1,55 (m, 1 H) 1,80 - 1,93 (m, 1 H) 2,00 - 2,15 (m, 2 H) 4,44 (dd, J = 7,91, 1,13 Hz, 1 H) 4,68 (d, J = 17,71 Hz, 1 H) 4,99 (d, J = 17,71 Hz, 1 H) 7,26 (s, 1 H) 7,50 (s, 1 H) 7,63 - 7,73 (m, 4 H) 7,78 - 7,87 (m, 3 H). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) ppm 22,58 - 22,97 (m, 1 C) 29,96 (d, J = 29,09 Hz, 1 C) 41,46 (d, J = 5,49 Hz, 1 C), 57,86, 110,97, 111,45 (d, J = 10,43 Hz, 1 C), 117,58, 119,11 (d, J = 25,80 Hz, 1 C), 124,89, 128,53, 128,56, 129,21, 131,17, 131,98, 137,44, 138,32, 158,99 (d, J = 247,54 Hz, 2 C), 170,25. ¹⁹F RMN, (CDCl₃, 282 MHz) δ: -116,5, -65,9. IR (KBr): 3443, 3342, 3210, 2955, 2245, 1699, 1577, 1476, 1163 cm⁻¹. Análisis calculado para C₁₉H₁₆ClF₄N₃O₃S Calculado. C, 47,75; H, 3,37; N, 8,79; S, 6,71; F, 15,90; Cl, 7,41. Encontrado: C, 47,95; H, 3,31; N, 8,67; S, 6,72; F, 15,59; Cl, 7,49.

Etapa B. (R)-2-(4-Cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxycarbamimidoil)bencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida



(2R)-2-[[4-(4-Clorofenil)sulfonil]m[[4-ciano-2-fluorofenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida (399 g) y metanol (1,6 l) se cargaron a un reactor seguido de hidroxilamina (solución al 50 % en agua, 93 ml, 1,8 equiv.). La mezcla se calentó a 45-50 °C hasta completar la reacción mediante HPLC (material de partida del PA relativo < 0,15). Se cargó lentamente agua (0,5 l), manteniendo la temperatura del lote entre 30-50 °C. El lote se dejó en reposo hasta que empezó la cristalización y después se cargó con agua (2,7 l). El lote se enfrió a 15-20 °C y se filtró. La torta se lavó con MeOH:agua a 2:1 (2 l) y después se secó al vacío a 50 °C para dar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (415 g, rendimiento de un 96 %). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1,43 - 1,64 (m, 1 H) 1,77 - 1,93 (m, 1 H) 1,93 - 2,17 (m, 2 H) 4,41 (dd, J = 8,48, 6,03 Hz, 1 H) 4,60 (d, J = 117,14 Hz, 1 H) 4,94 (d, J = 16,77 Hz, 1 H) 5,81 - 5,98 (m, 2 H) 7,19 - 7,27 (m, 1 H) 7,37 - 7,47 (m, 2 H) 7,52 (d, J = 4,14 Hz, 2 H) 7,64 (d, J = 8,67 Hz, 2 H) 7,85 (d, J = 8,85 Hz, 2 H) 9,71 - 9,83 (m, 1 H). IR (KBr): 3491, 3379, 1680, 1651, 1592, 1433, 1343. Análisis calculado para C₁₉H₁₉ClF₄N₄O₄S Calculado. C, 44,66; H, 3,74; N, 10,96; S, 6,27; F, 14,87; Cl, 6,94. Encontrado: C, 44,90; H, 3,91; N, 10,91; S, 6,41; F, 15,21; Cl, 6,95.

Etapa C. (2R)-2-[[4-(4-Clorofenil)sulfonil]m[[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida



(R)-2-(4-Cloro-N-(2-fluoro-4-(N'-hidroxycarbamimidoil)bencil)fenilsulfonamido)-5,5,5-trifluoropentanamida (246 g) se cargó a un reactor seguido de 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 del PA relativo < 0,15). Se cargó metanol (1,48 l) en una porción, seguido de 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 a 2:6:5 y se secó en una bandeja al vacío a 50-60 °C, dando el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (228 g, rendimiento de un 90 %). ¹H RMN, (CDCl₃, 300 MHz) δ: 1,40 - 1,58 (m, 1 H) 1,75 - 1,90 (m, 1 H) 1,92 - 2,07 (m, 1 H) 2,10 - 2,26 (m, 1 H) 4,37 (dd, J = 8,67, 6,22 Hz, 1 H) 4,48 (d, J = 15,64 Hz, 1 H) 4,64 (d, J = 15,82 Hz, 1 H) 5,54 (s, 1 H) 6,33 (s, 1 H) 7,44 - 7,54 (m, 2 H) 7,62 (t, J = 7,72 Hz, 1 H) 7,68 - 7,76 (m, 3 H) 7,85 (dd, J = 7,91, 1,51 Hz, 1 H) 8,76 (s, 1 H). ¹³C RMN, (DMSO-d₆, 75 MHz) δ: 170,34, 167,75, 165,80, 159,64 (d, J = 244,5 Hz, 1 C), 138,19, 137,64, 131,25 (d, J = 3,75 Hz, 1 C), 129,31, 129,23, 129,05 (d, J = 14,25 Hz, 1 C), 126,74 (c, J = 274,5 Hz, 1 C), 126,91, 126,80, 123,12 (d, J = 3,75 Hz, 1 C), 113,7 (d, J = 24,0 Hz, 1 C), 57,92, 41,38 (d, J = 4,5 Hz, 1 C), 30,04 (d, J = 30,0 Hz, 1 C), 22,90. ¹⁹F RMN, (CDCl₃, 282 MHz) δ: -116,3, -66,5. IR (KBr): 3454, 334, 3286, 2952, 1705, 1432, 1325, 1260, 1167, 1084, 828 cm⁻¹. Análisis calculado para C₂₀H₁₇ClF₄N₄O₄S Calculado. C, 46,11; H, 3,29; N, 10,71; S, 6,15; F, 14,58; Cl, 6,80. Encontrado C, 46,06; H, 3,24; N, 10,71; S, 6,25; F, 14,60; Cl, 6,88.

REIVINDICACIONES

1. (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida para uso en el tratamiento de traumatismo craneal, lesión cerebral traumática y/o demencia pugilística.
- 5 2. (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida para el uso de la reivindicación 1 para el tratamiento del traumatismo craneal.
3. (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida para el uso de la reivindicación 1 para el tratamiento de la lesión cerebral traumática.
4. (2R)-2-[[[(4-clorofenil)sulfonil][[2-fluoro-4-(1,2,4-oxadiazol-3-il)fenil]metil]amino]-5,5,5-trifluoropentanamida para el uso de la reivindicación 1 para el tratamiento de la demencia pugilística.