

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 593**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/10** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 403/10** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 11723091 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2588466**

54 Título: **Derivados de 5-amino-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona útiles como inhibidores de beta-secretasa (BACE)**

30 Prioridad:

**09.06.2010 EP 10165336**

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

**09.05.2014**

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA, N.V. (100.0%)  
Turnhoutseweg 30  
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**TRABANCO-SUÁREZ, ANDRÉS, AVELINO;  
TRESADERN, GARY, JOHN;  
MACDONALD, GREGOR, JAMES y  
VEGA RAMIRO, JUAN, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 459 593 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

Derivados de 5-amino-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona útiles como inhibidores de beta-secretasa (BACE)

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a derivados novedosos de 5-amino-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona como inhibidores de beta-secretasa, también conocida como enzima de escisión de amiloide en el sitio beta, BACE, BACE1, Asp2 o memapsina 2. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos, a procedimientos para preparar tales compuestos y composiciones, y al uso de tales compuestos y composiciones para la prevención y el tratamiento de trastornos en los que está implicada la beta-secretasa, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve, senilidad, demencia, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, demencia asociada con accidente cerebrovascular, demencia asociada con enfermedad de Parkinson o demencia asociada con beta-amiloide.

15

**Antecedentes de la invención**

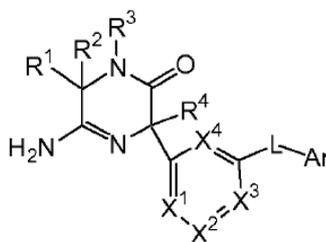
La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa asociada con el envejecimiento. Los pacientes con EA presentan déficits cognitivos y pérdida de memoria así como problemas conductuales tales como ansiedad. Más del 90% de los afectados con EA tienen una forma esporádica del trastorno mientras menos del 10% de los casos son familiares o hereditarios. En los Estados Unidos, aproximadamente 1 de cada 10 personas a la edad de 65 años tiene EA mientras a la edad de 85 años, 1 de cada dos individuos está afectado con EA. La esperanza de vida promedio desde el diagnóstico inicial es de 7-10 años, y los pacientes con EA requieren de amplios cuidados o bien en una residencia asistida que es muy costoso o bien por miembros de la familia. Con el número en aumento de ancianos en la población, la EA es una preocupación médica creciente. Las terapias disponibles actualmente para la EA meramente tratan los síntomas de la enfermedad e incluyen inhibidores de la acetilcolinesterasa para mejorar las propiedades cognitivas así como ansiolíticos y antipsicóticos para controlar los problemas conductuales asociados con esta dolencia.

Las características patológicas distintivas en el cerebro de pacientes con EA son ovillos neurofibrilares que se generan mediante hiperfosforilación de la proteína tau y placas amiloides que se forman mediante agregación de péptido de beta-amiloide 1-42 (Abeta 1-42). Abeta 1-42 forma oligómeros y luego fibrillas, y en última instancia placas amiloides. Se cree que los oligómeros y las fibrillas son especialmente neurotóxicos y pueden provocar la mayor parte del daño neurológico asociado con EA. Los agentes que previenen la formación de Abeta 1-42 tienen el potencial de ser agentes modificadores de la enfermedad para el tratamiento de EA. Abeta 1-42 se genera a partir de la proteína precursora amiloide (APP), que se compone de 770 aminoácidos. El extremo N-terminal de Abeta 1-42 se escinde por la beta-secretasa (BACE), y luego la gamma-secretasa escinde el extremo C-terminal. Además de Abeta 1-42, la gamma-secretasa también libera Abeta 1-40 que es el producto de escisión predominante así como Abeta 1-38 y Abeta 1-43. Estas formas de Abeta también pueden agregarse para formar oligómeros y fibrillas. Por tanto, se esperaría que inhibidores de BACE prevengan la formación de Abeta 1-42 así como Abeta 1-40, Abeta 1-38 y Abeta 1-43 y que sean agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de EA.

35

**Sumario de la invención**

45 La presente invención se refiere a 5-amino-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-onas de fórmula (I)



y las formas estereoisoméricas de las mismas, en la que

50

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> son hidrógeno;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> son independientemente metilo o etilo;

55

X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> son CH o CF;

$X^2$  y  $X^4$  son CH;

L es un enlace o  $-N(R^6)CO-$  en el que  $R^6$  es hidrógeno;

5 Ar es heteroarilo;

heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en piridilo, pirimidinilo y pirazilo, cada uno opcionalmente sustituido con cloro, ciano, metilo, metoxilo o trifluorometilo.

10 Es ilustrativa de la invención una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y cualquiera de los compuestos descritos anteriormente. Una ilustración de la invención es una composición farmacéutica preparada mezclando cualquiera de los compuestos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Ilustra la invención un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar cualquiera de los compuestos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente  
15 aceptable.

Un ejemplo de la invención es cualquiera de los compuestos descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de: (a) enfermedad de Alzheimer, (b) deterioro cognitivo leve, (c) senilidad, (d) demencia, (e) demencia con cuerpos de Lewy, (f) síndrome de Down, (g) demencia asociada con accidente cerebrovascular, (h) demencia asociada con  
20 enfermedad de Parkinson y (i) demencia asociada con beta-amiloide, en un sujeto que lo necesita.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) tal como se definieron anteriormente en el presente  
25 documento, y a sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de fórmula (I) son inhibidores de la enzima beta-secretasa (también conocida como enzima de escisión en el sitio beta, BACE, BACE1, Asp2 o memapsina 2), y son útiles en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, senilidad, demencia, demencia asociada con accidente cerebrovascular, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, demencia asociada con enfermedad de Parkinson y demencia asociada con beta-amiloide, preferiblemente  
30 enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve o demencia, más preferiblemente enfermedad de Alzheimer.

En una realización de la presente invención,

35  $R^1$ ,  $R^2$  son hidrógeno;  $R^3$ ,  $R^4$  son metilo;  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$ ,  $X^4$  son CH; L es  $-N(R^6)CO-$  en el que  $R^6$  es hidrógeno; Ar es heteroarilo; heteroarilo es piridilo sustituido con cloro, ciano, metoxilo o trifluorometilo, pirimidinilo o pirazilo sustituido con metilo.

### Definiciones

40 "Halógeno" indicará fluoro, cloro y bromo; "alquilo  $C_{1-3}$ " indicará un grupo alquilo saturado lineal o ramificado que tiene 1, 2 ó 3 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, 1-propilo y 2-propilo; "alquioxilo  $C_{1-3}$ " indicará un radical éter en el que alquilo  $C_{1-3}$  es tal como se definió anteriormente; "mono y polihaloalquilo  $C_{1-3}$ " indicará alquilo  $C_{1-3}$  tal como se definió anteriormente, sustituido con 1, 2, 3 o cuando sea posible con más átomos de halógeno tal como se definió anteriormente; "mono y polihaloalquioxilo  $C_{1-3}$ " indicará un radical éter en el que mono y polihaloalquilo  $C_{1-3}$   
45 es tal como se definió anteriormente; "cicloalquilo  $C_{3-6}$ " indicará ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo; "cicloalcanodiilo  $C_{3-6}$ " indicará un radical bivalente tal como ciclopropanodiilo, ciclobutanodiilo, ciclopentanodiilo y ciclohexanodiilo.

50 El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente a mamífero, lo más preferiblemente un ser humano, que es o ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento, significa que la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que logra la respuesta biológica o farmacéutica en un sistema tisular, animal o ser humano que está buscándose por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico clínico,  
55 que incluye alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que esté tratándose.

Tal como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los componentes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulta, directa o indirectamente, de combinaciones de los componentes especificados en las cantidades especificadas.  
60

Se apreciará que algunos de los compuestos según la fórmula (I) y las sales de adición, hidratos y solvatos de los mismos pueden contener uno o más centros de quiralidad y existir como formas estereoisoméricas.

65 Anteriormente en el presente documento y a continuación en el presente documento, el término "compuesto de fórmula (I)" pretende incluir las sales de adición, los solvatos y los estereoisómeros del mismo.

El término “estereoisómeros” o “formas estereoquímicamente isoméricas” anteriormente en el presente documento o a continuación en el presente documento se usan de manera intercambiable.

5 La invención incluye todos los estereoisómeros del compuesto de fórmula (I) o bien como un estereoisómero puro o bien como una mezcla de dos o más estereoisómeros.

10 Los enantiómeros son estereoisómeros que no son imágenes especulares superpuestas entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es un racemato o una mezcla racémica. Los diastereómeros (o diastereoisómeros) son estereoisómeros que no son enantiómeros, es decir ellos no están relacionados como imágenes especulares. Si un compuesto contiene un doble enlace, los sustituyentes pueden estar en la configuración E o Z. Si un compuesto contiene un grupo cicloalquilo disustituido, los sustituyentes pueden estar en la configuración cis o trans. Por tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros, racematos, isómeros E, isómeros Z, isómeros cis, isómeros trans y mezclas de los mismos.

15 La configuración absoluta se especifica según el sistema de Cahn-Ingold-Prelog. La configuración en un átomo asimétrico se especifica mediante o bien R o bien S. Los compuestos resueltos cuya configuración absoluta no se conoce pueden designarse mediante (+) o (-) dependiendo del sentido en el que hacen rotar luz polarizada plana.

20 Cuando se identifica un estereoisómero específico, esto significa que dicho estereoisómero está sustancialmente libre, es decir asociado con menos del 50%, preferiblemente menos del 20%, más preferiblemente menos del 10%, incluso más preferiblemente menos del 5%, en particular menos del 2% y lo más preferiblemente menos del 1%, de los demás isómeros. Por tanto, cuando un compuesto de fórmula (I) se especifica por ejemplo como (R), esto significa que el compuesto está sustancialmente libre del isómero (S); cuando un compuesto de fórmula (I) se especifica por ejemplo como E, esto significa que el compuesto está sustancialmente libre del isómero Z; cuando un compuesto de fórmula (I) se especifica por ejemplo como cis, esto significa que el compuesto está sustancialmente libre del isómero trans.

30 Además, algunas de las formas cristalinas para los compuestos de la presente invención pueden existir como polimorfos y como tal pretenden estar incluidos en la presente invención. Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes, y también se pretende que tales solvatos estén abarcados dentro del alcance de esta invención.

35 Para su uso en medicina, las sales de los compuestos de esta invención se refieren a “sales farmacéuticamente aceptables” no tóxicas. Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación de compuestos según esta invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos incluyen sales de adición de ácido que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una disolución del compuesto con una disolución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Además, cuando los compuestos de la invención portan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de calcio o magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, por ejemplo, sales de amonio cuaternario.

45 Los ácidos representativos que pueden usarse en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, aminoácidos acilados, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido (+)-canfórico, ácido canforsulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido L-glutámico, ácido beta-oxo-glutárico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido (+)-L-láctico, ácido (±)-DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido (±)-DL-mandélico, ácido metanosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluorometilsulfónico y ácido undecilénico. Las bases representativas que pueden usarse en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: amoniaco, L-arginina, benetamina, benzetamina, hidróxido de calcio, colina, dimetiletanolamina, dietanolamina, dietilamina, 2-(dietilamino)-etanol, etanolamina, etilendiamina, N-metil-glucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, L-lisina, hidróxido de magnesio, 4-(2-hidroxi-etil)-morfolina, piperazina, hidróxido de potasio, 1-(2-hidroxi-etil)-pirrolidina, amina secundaria, hidróxido de sodio, trietanolamina, trometamina e hidróxido de zinc.

65 Los nombres químicos de los compuestos de la presente invención se generaron según las reglas de nomenclatura acordadas por Chemical Abstracts Service.

Algunos de los compuestos según la fórmula (I) también pueden existir en su forma tautomérica. Tales formas

aunque indicadas explícitamente en la fórmula anterior se pretende que estén incluidas dentro del alcance de la presente invención.

PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

5

Procedimiento experimental 1

Pueden prepararse los compuestos finales según la fórmula (I), haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (II) con una fuente de amoníaco apropiada tal como, por ejemplo, cloruro de amonio o amoníaco acuoso, según el esquema de reacción (1), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, agua o metanol, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 60°C, por ejemplo durante 6 horas. En el esquema de reacción (1), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I).

10



15

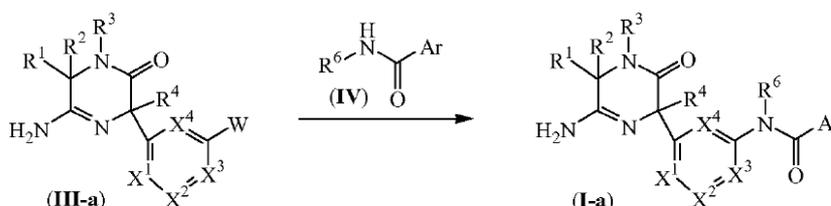
Esquema de reacción 1

Procedimiento experimental 2

Pueden prepararse los compuestos finales según la fórmula (I-a) en la que L es -N(R<sup>6</sup>)CO-, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (III-a) con un compuesto de fórmula (IV) según el esquema de reacción (2), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, *N,N*-dimetilformamida, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, un catalizador de cobre tal como, por ejemplo, CuI y una diamina tal como por ejemplo (1*R*,2*R*)-(–)-1,2-diaminociclohexano, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 180°C, por ejemplo durante 140 minutos con irradiación de microondas. En el esquema de reacción (2), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I) y W es halógeno.

20

25



30

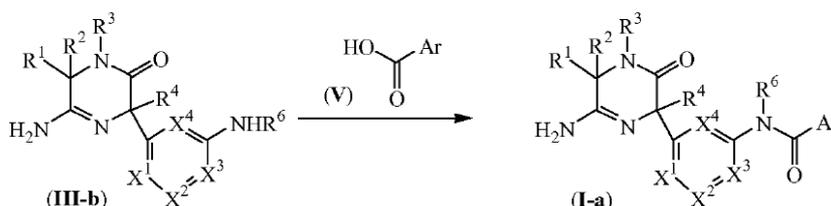
Esquema de reacción 2

Procedimiento experimental 3

Adicionalmente, pueden prepararse los compuestos finales según la fórmula (I-a), haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (III-b) con un compuesto de fórmula (V) según el esquema de reacción (3), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, diclorometano, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, trietilamina, en presencia de un agente de condensación tal como por ejemplo hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametiluronio [HATU, CAS 148893-10-1], en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 25°C, por ejemplo durante 2 horas. En el esquema de reacción (3), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I).

35

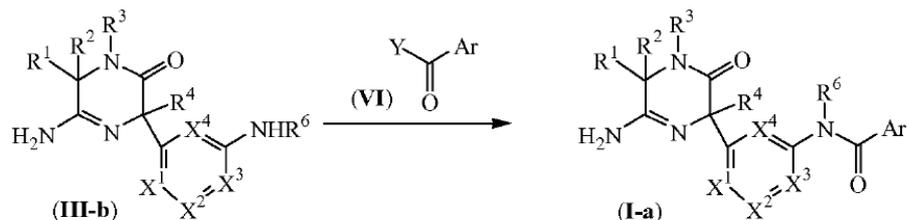
40



Esquema de reacción 3

Procedimiento experimental 4

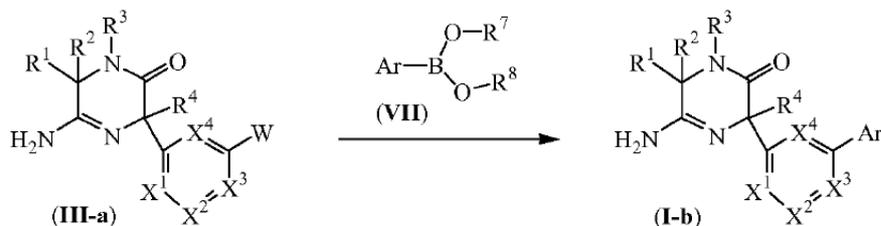
Adicionalmente, pueden prepararse los compuestos finales según la fórmula (I-a), haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (III-b) con un compuesto de fórmula (VI) según el esquema de reacción (4), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, diclorometano, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, piridina, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 25°C, por ejemplo durante 2 horas. En el esquema de reacción (4), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I) e Y es halógeno.



Esquema de reacción 4

Procedimiento experimental 5

Pueden prepararse los compuestos finales según la fórmula (I-b) en la que L es un enlace, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (III-a) con un compuesto de fórmula (VII) según el esquema de reacción (5), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, etanol o mezclas de disolventes inertes tales como, por ejemplo, 1,2-dimetoxietano/agua/etanol, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuosos, un catalizador de complejo de Pd tal como, por ejemplo, [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) [CAS 72287-26-4] o diacetato de trans-(bisdiciclohexilamina)paladio [DAPCy, CAS 628339-96-8] en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 80°C, por ejemplo durante 48 horas o por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 130°C, por ejemplo durante 10 minutos con irradiación de microondas. En el esquema de reacción (5), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I) y W es halógeno. R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> pueden ser hidrógeno o alquilo, o pueden tomarse juntos para formar, por ejemplo, un radical bivalente de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-.

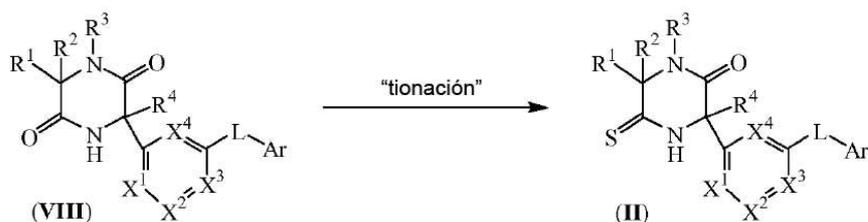


Esquema de reacción 5

Varios productos intermedios y materiales de partida en las preparaciones anteriores son compuestos conocidos que pueden prepararse según metodologías conocidas en la técnica de preparación de dichos compuestos o similares y algunos productos intermedios son nuevos. Se describirán varios métodos de preparación de este tipo a continuación en el presente documento en más detalle.

Procedimiento experimental 6

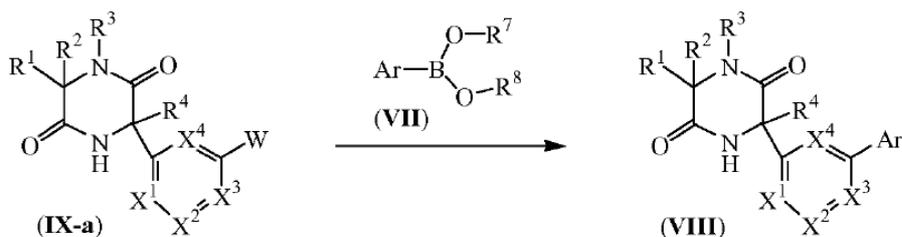
Pueden prepararse los productos intermedios según la fórmula (II) haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (VIII) con un reactivo donador de azufre adecuado para la síntesis de tioamidas tales como, por ejemplo, pentasulfuro de fósforo o 2,4-disulfuro de 2,4-bis-(4-metoxifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetano [reactivo de Lawesson, CAS 19172-47-5] según el esquema de reacción (6), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción, tal como por ejemplo, tetrahidrofurano o tolueno, en presencia de una base adecuada tal como, por ejemplo, piridina, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 90°C, por ejemplo durante 18 horas. En el esquema de reacción (6), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I).



Esquema de reacción 6

Procedimiento experimental 7

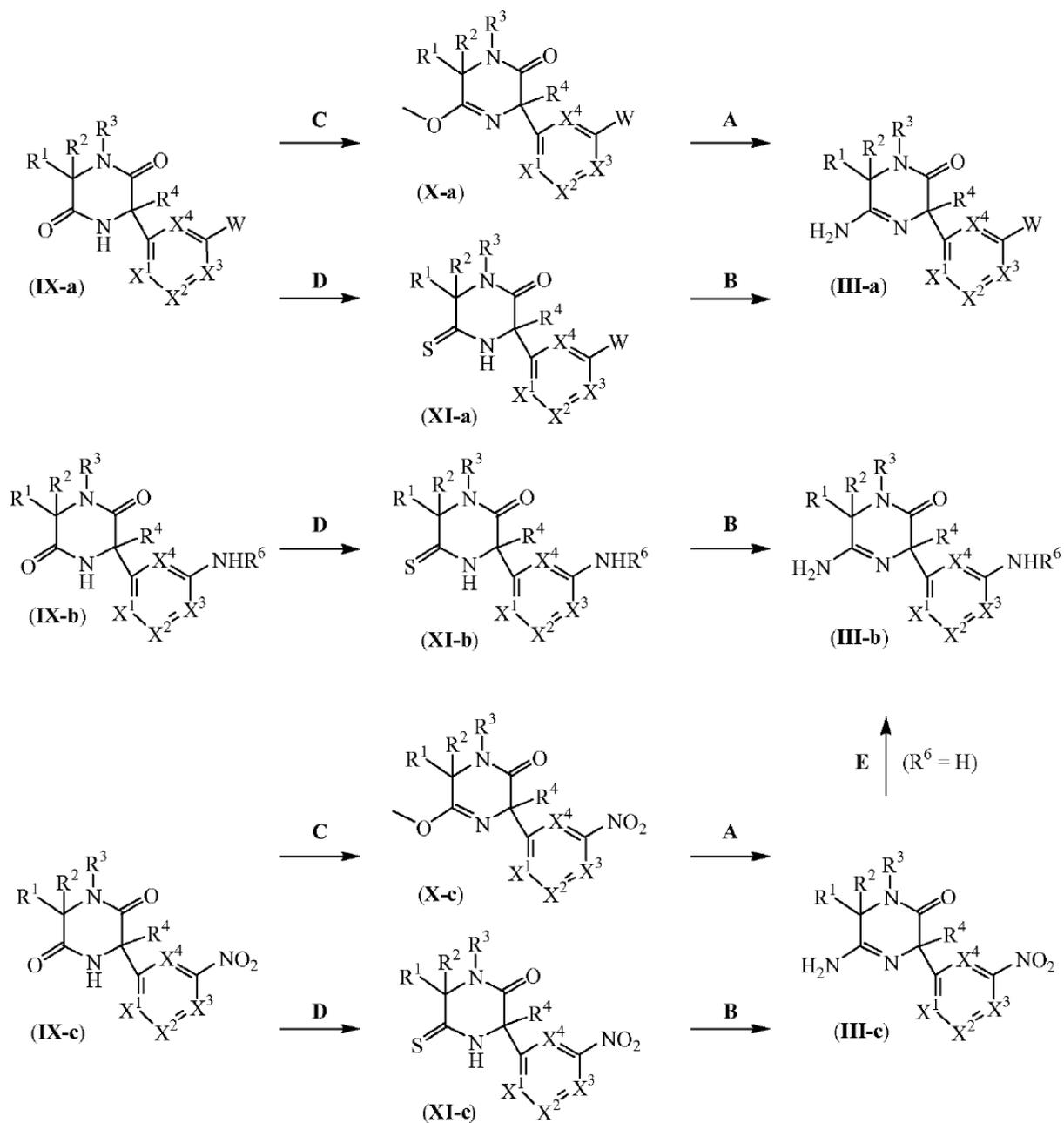
- 5 Pueden prepararse los productos intermedios según la fórmula (VIII) en la que L es un enlace, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (IX-a) con un compuesto de fórmula (VII) según el esquema de reacción (7), una reacción que se realiza en una mezcla adecuada de disolventes inertes tales como, por ejemplo, 1,4-dioxano/agua, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso, un catalizador de
- 10 complejo de Pd tal como, por ejemplo, tetrakis-(trifenilfosfina)paladio (0) [CAS 14221-01-3] en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 80°C, por ejemplo durante 20 horas o por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 150°C, por ejemplo durante 15 minutos con irradiación de microondas. En el
- 15 esquema de reacción (7), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I) y W es halógeno. R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> pueden ser hidrógeno o alquilo, o pueden tomarse juntos para formar por ejemplo un radical bivalente de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-.



Esquema de reacción 7

20 Procedimiento experimental 8

Pueden prepararse generalmente los compuestos intermedios de fórmula (III-a), (III-b) y (III-c) siguiendo las etapas de reacción mostradas en los esquemas de reacción (8) y (9) a continuación.



Esquema de reacción 8

- 5 A: conversión de metoxiimina en amidina
- B: conversión de tioamida en amidina
- C: conversión de amida en metoxiimina
- 10 D: conversión de amida en tioamida (tionación)
- E: reducción de nitro a amino

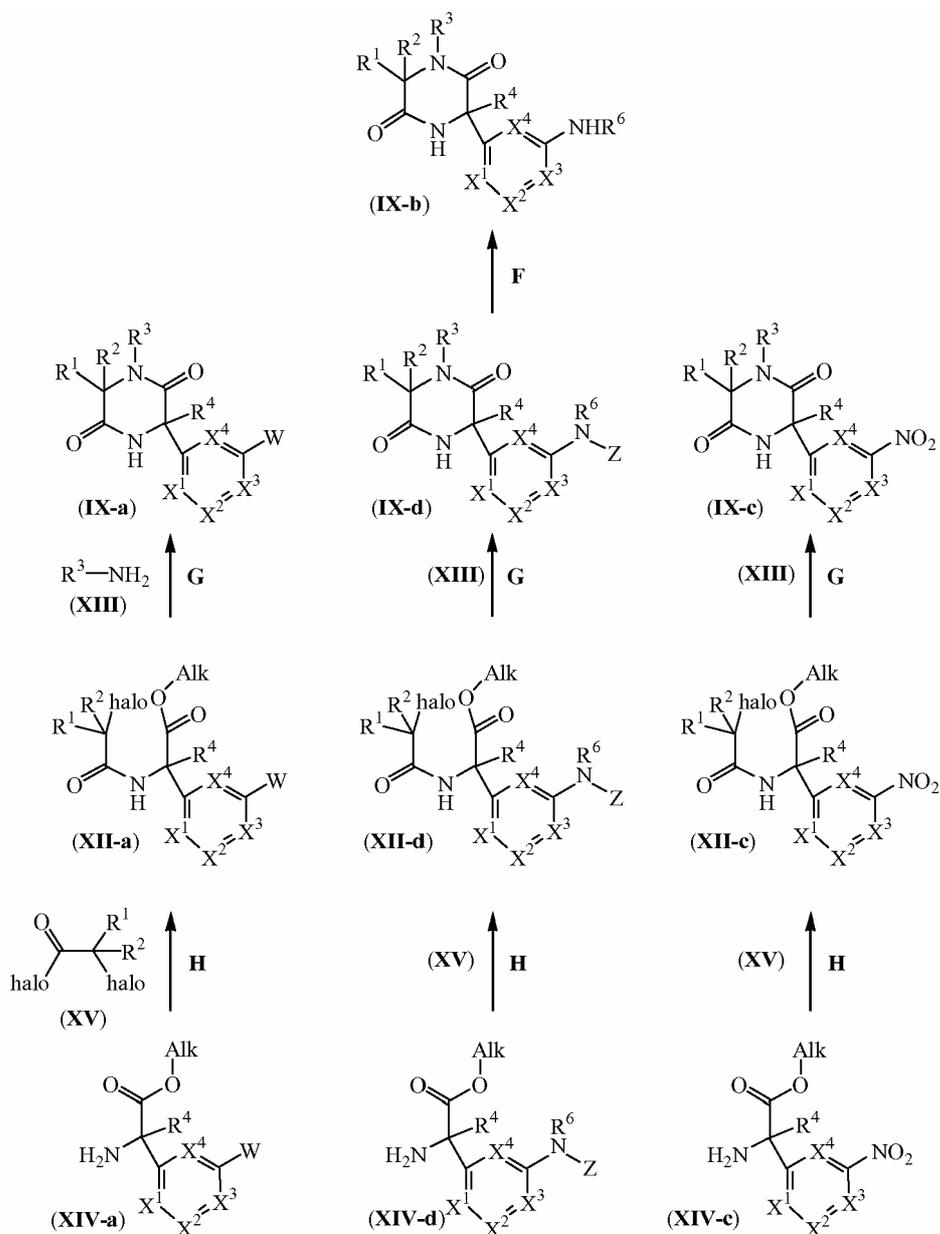
15 Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (III-a), (III-b) y (III-c) en el esquema de reacción (8) anterior a partir de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (XI-a), (XI-b) y (XI-c) siguiendo procedimientos de conversión de tioamida en amidina conocidos en la técnica (etapa de reacción B) o alternativamente, para compuestos intermedios de fórmula (III-a) y (III-c), a partir de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (X-a) y (X-c) siguiendo procedimientos de conversión de metoxiimina en amidina conocidos en la técnica

(etapa de reacción A). Dichas conversiones pueden llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (XI-a), (XI-b) y (XI-c) o (X-a) y (X-c) con una fuente de amoniaco tal como, por ejemplo, cloruro de amonio o amoniaco acuoso, en un disolvente inerte para la reacción adecuado tal como, por ejemplo, agua o metanol y similares, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a de 70°C a 85°C, por ejemplo, durante de 6 horas a 18 horas.

Adicionalmente pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (III-b) en el esquema de reacción (8) anterior, en los que  $R^6 = H$ , a partir de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (III-c) siguiendo procedimientos de reducción de nitro a amino conocidos en la técnica (etapa de reacción E). Dicha reducción puede llevarse a cabo convenientemente siguiendo procedimientos de hidrogenación catalítica conocidos en la técnica. Por ejemplo, dicha reducción puede llevarse a cabo agitando los reactantes bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador apropiado tal como, por ejemplo, paladio sobre carbón, platino sobre carbón, níquel Raney y catalizadores similares. Disolventes adecuados son, por ejemplo, agua, alcanoles, por ejemplo metanol, etanol y similares, ésteres, por ejemplo acetato de etilo y similares. Con el fin de potenciar la velocidad de dicha reacción de reducción puede ser ventajoso elevar la temperatura y/o la presión de la mezcla de reacción. Puede impedirse la hidrogenación adicional no deseada de determinados grupos funcionales en los reactantes y los productos de reacción mediante la adición de un veneno de catalizador tal como, por ejemplo, tiofeno y similares, a la mezcla de reacción.

Pueden prepararse compuestos intermedios de fórmula (X-a) y (X-c) en el esquema de reacción (8) anterior, a partir de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (IX-a) y (IX-c) siguiendo procedimientos de conversión de amida en metoxiimina conocidos en la técnica (etapa de reacción C). Dicha conversión puede llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (IX-a) y (IX-c) con un agente de metilación tal como, por ejemplo, tetrafluoroborato de trimetiloxonio, en un disolvente inerte para la reacción adecuado tal como, por ejemplo, diclorometano, a una temperatura moderadamente alta tal como, por ejemplo, de 25°C, por ejemplo durante 60 horas.

Pueden prepararse los derivados de tioamida de fórmula (XI-a), (XI-b) y (XI-c) en el esquema de reacción (8) anterior, a partir de derivados de amida de fórmula (IX-a), (IX-b) y (IX-c) siguiendo procedimientos de tionación conocidos en la técnica (etapa de reacción D). Dicha conversión puede llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de dichas amidas con un agente de tionación tal como, por ejemplo, pentasulfuro de fósforo o 2,4-disulfuro de 2,4-bis-(4-metoxifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetano [reactivo de Lawesson, CAS 19172-47-5], en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, piridina, en un disolvente inerte para la reacción tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano o tolueno, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 90°C, por ejemplo durante 18 horas.



Esquema de reacción 9

F: N-desprotección

5 G: ciclación

H: N-acilación

10 Pueden prepararse los productos intermedios según la fórmula (IX-b) en el esquema de reacción (9) anterior, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (IX-d), en la que Z es un grupo protector de aminas tal como, por ejemplo, el grupo p-metoxibencilo, siguiendo procedimientos de N-desprotección de aminas conocidos en la técnica (etapa de reacción F). Dicha N-desprotección puede llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (IX-d) con un agente de desprotección adecuado de la función amina tal como, por ejemplo, nitrato de amonio y cerio (IV), en una mezcla de disolventes inertes tales como, por ejemplo, acetonitrilo/agua, a una temperatura moderadamente alta tal como, por ejemplo, de 15 25°C, por ejemplo durante 4 horas.

20 Pueden prepararse los productos intermedios según la fórmula (IX-a), (IX-c) y (IX-d) en el esquema de reacción (9) anterior, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (XII-a), (XII-c) y (XII-d) siguiendo procedimientos de ciclación conocidos en la técnica (etapa de reacción G). Dicha ciclación puede llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (XII-a), (XII-c) y (XII-d) con un

compuesto intermedio de fórmula (XIII), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, etanol, en condiciones térmicas tales como, por ejemplo, calentar la mezcla de reacción a 70°C, por ejemplo durante 3 horas. En el esquema de reacción (9), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I), halo es cloro o bromo y Alk es alquilo C<sub>1-3</sub>.

5 Pueden prepararse los productos intermedios según la fórmula (XII-a), (XII-c) y (XII-d) en el esquema de reacción (9) anterior, haciendo reaccionar un compuesto intermedio de fórmula (XIV-a), (XIV-c) y (XIV-d) siguiendo procedimientos de *N*-acilación conocidos en la técnica (etapa de reacción H). Dicha *N*-acilación puede llevarse a cabo convenientemente mediante tratamiento de los compuestos intermedios correspondientes de fórmula (XIV-a),  
10 (XIV-c) y (XIV-d) con un compuesto intermedio de fórmula (XV), una reacción que se realiza en un disolvente inerte para la reacción adecuado, tal como, por ejemplo, diclorometano, en presencia de una base adecuada, tal como, por ejemplo, trietilamina, a baja temperatura tal como, por ejemplo, de 0°C, por ejemplo durante 1 hora. En el esquema de reacción (9), todas las variables se definen tal como en la fórmula (I), halógeno es cloro o bromo y Alk es alquilo C<sub>1-3</sub>.

15 Pueden prepararse generalmente los compuestos intermedios de fórmula (XIV-a), (XIV-c) y (XIV-d), en los que Z es un grupo protector de *N* adecuado tal como, por ejemplo el grupo *p*-metoxibencilo, siguiendo procedimientos de tipo Strecker conocidos en la técnica.

## 20 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención proporciona además composiciones para prevenir o tratar enfermedades en las que es beneficiosa la inhibición de la beta-secretasa, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve, senilidad, demencia, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, demencia asociada con accidente cerebrovascular, demencia asociada con enfermedad de Parkinson y demencia asociada con beta-amiloide, comprendiendo dichas composiciones una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la fórmula (I) y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 Aunque es posible que el principio activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la presente invención, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables. El portador o diluyente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la composición y no ser perjudicial para los receptores del mismo.

35 Pueden prepararse las composiciones farmacéuticas de esta invención mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, en forma de base o en forma de sal de adición, como principio activo se combina en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma de dosificación unitaria adecuada, preferiblemente, para la administración sistémica tal como administración oral, percutánea o parenteral; o la administración tópica tal como mediante inhalación, un aerosol nasal, colirios o mediante una crema, un gel, un champú o similar. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en forma de dosificación oral, pueden emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y disoluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad en la administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para las composiciones parenterales, el portador comprenderá habitualmente agua estéril, al menos en gran parte, aunque pueden incluirse otros componentes, por ejemplo, para ayudar a la solubilidad. Pueden prepararse disoluciones inyectables, por ejemplo, en las que el portador comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de solución salina y disolución de glucosa. También pueden prepararse suspensiones inyectables en cuyo caso pueden emplearse portadores, agentes de suspensión y similares líquidos apropiados. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente de potenciación de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinados opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, aditivos que no provocan ningún efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones pueden administrarse de diversas maneras, por ejemplo, como un parche transdérmico, como una pipeta para la aplicación en la piel (*spot-on*) o como una pomada.

60 Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones del presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el portador farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas unitarias de dosificación son comprimidos (incluyendo

comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, pastillas, paquetes de polvo, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas soperas y similares, y múltiples segregados de los mismos.

La dosificación exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto de fórmula (I) particular usado, el estado particular que esté tratándose, la gravedad del estado que esté tratándose, la edad, el peso, el sexo, la extensión del trastorno y el estado físico general del paciente particular así como otra medicación que el individuo pueda estar tomando, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención.

Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica comprenderá desde el 0,05 hasta el 99% en peso, preferiblemente desde el 0,1 hasta el 70% en peso, más preferiblemente desde el 0,1 hasta el 50% en peso del principio activo, y, desde el 1 hasta el 99,95% en peso, preferiblemente desde el 30 hasta el 99,9% en peso, más preferiblemente desde el 50 hasta el 99,9% en peso de un portador farmacéuticamente aceptable, basándose todos los porcentajes en el peso total de la composición.

Los presentes compuestos pueden usarse para la administración sistémica tal como administración oral, percutánea o parenteral; o la administración tópica tal como mediante inhalación, un aerosol nasal, colirios o mediante una crema, un gel, un champú o similares. Los compuestos se administran preferiblemente por vía oral. La dosificación exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto particular según la fórmula (I) usado, el estado particular que esté tratándose, la gravedad del estado que esté tratándose, la edad, el peso, el sexo, la extensión del trastorno y el estado físico general del paciente particular así como otra medicación que el individuo pueda estar tomando, tal como conocen bien los expertos en la técnica. Además, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz puede disminuirse o aumentarse dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención.

La cantidad de un compuesto de fórmula (I) que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo de la enfermedad tratada, la especie de mamífero y el modo de administración particular. Sin embargo, como guía general, las dosis unitarias adecuadas para los compuestos de la presente invención pueden contener, por ejemplo, preferiblemente entre 0,1 mg y aproximadamente 1000 mg del compuesto activo. Una dosis unitaria preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 500 mg. Una dosis unitaria más preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 300 mg. Una dosis unitaria incluso más preferida es de entre 1 mg y aproximadamente 100 mg. Tales dosis unitarias pueden administrarse más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6 veces al día, pero preferiblemente 1 ó 2 veces al día, de manera que la dosificación total para un adulto de 70 kg está en el intervalo de 0,001 a aproximadamente 15 mg por kg de peso del sujeto por administración. Una dosificación preferida es de 0,01 a aproximadamente 1,5 mg por kg de peso del sujeto por administración, y tal terapia puede extenderse durante varias semanas o meses, y en algunos casos, años. Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del individuo que esté tratándose; el momento y la vía de administración; la tasa de excreción; otros fármacos que se hayan administrado previamente; y la gravedad de la enfermedad particular que esté sometiéndose a terapia, tal como entienden bien los expertos en el área.

Una dosificación típica puede ser un comprimido de 1 mg a aproximadamente 100 mg o de 1 mg a aproximadamente 300 mg tomado una vez al día, o, múltiples veces al día, o una cápsula o un comprimido de liberación programada tomado una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente mayor de principio activo. El efecto de liberación programada puede obtenerse mediante materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que se liberan lentamente mediante presión osmótica, o mediante cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

En algunos casos puede ser necesario usar dosificaciones fuera de estos intervalos, tal como resultará evidente para los expertos en la técnica. Además, se observa que el médico clínico o médico que trata sabrá cómo y cuándo empezar, interrumpir, ajustar, o terminar la terapia junto con la respuesta del paciente individual.

Para las composiciones, los métodos y los kits proporcionados anteriormente, un experto en la técnica entenderá que los compuestos preferidos para su uso en cada uno son aquellos compuestos que se indicaron como preferidos anteriormente. Compuestos preferidos todavía adicionales para las composiciones, los métodos y los kits son aquellos compuestos proporcionados en los ejemplos no limitativos a continuación.

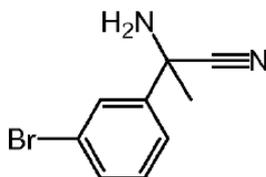
## PARTE EXPERIMENTAL

A continuación en el presente documento, el término "p.f." significa punto de fusión, "THF" significa tetrahidrofurano, "DMF" significa dimetilformamida, "DCM" significa diclorometano, "AcOEt" significa acetato de etilo, "AcOH" significa ácido acético, "MeOH" significa metanol, "rac" significa racémico.

### A. Preparación de los productos intermedios

Ejemplo A1Preparación del producto intermedio 1: rac-2-amino-2-(3-bromo-fenil)-propionitrilo

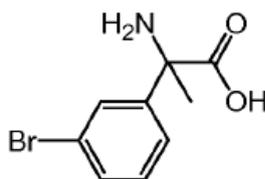
5



10 Se añadió cianuro de tetrametilsililo (25.±2 ml, 201 mmol) a una disolución con agitación de 3-bromo-acetofenona (25 g, 125,6 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (13,4 g, 251,2 mmol) en NH<sub>3</sub>/MeOH (500 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 días. Se evaporó luego el disolvente a vacío y se llevó el residuo a AcOEt. Se retiró por filtración el sólido y se evaporó el disolvente a vacío produciendo el producto intermedio 1 (26 g, rendimiento del 92%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo A2

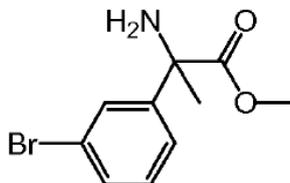
15

Preparación del producto intermedio 2: ácido rac-2-amino-2-(3-bromo-fenil)-propiónico

20 Se disolvió el producto intermedio 1 (26 g, 115,5 mmol) en HCl 6N (139 ml) y se sometió a reflujo la mezcla durante 18 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se evaporaron los disolventes a vacío produciendo el producto intermedio 2 (24 g, rendimiento del 85%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

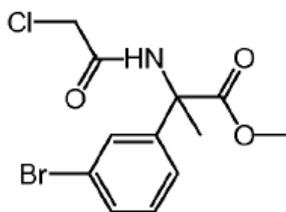
Ejemplo A3

25

Preparación del producto intermedio 3: éster metílico del ácido rac-2-amino-2-(3-bromo-fenil)-propiónico

30 Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (8,97 ml, 122,9 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 2 (10 g, 41 mmol) en MeOH (125 ml) a 0°C. Luego, se sometió a reflujo la mezcla durante 18 horas. Se evaporaron los disolventes a vacío y se repartió el residuo entre Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; AcOEt en DCM de 0/100 a 30/70). Se recogieron las fracciones  
35 deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 3 (4,1 g, rendimiento del 39%) como un aceite incoloro.

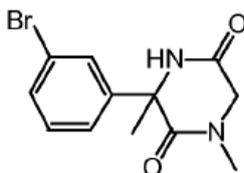
Ejemplo A440 Preparación del producto intermedio 4: éster metílico del ácido 2-(3-bromo-fenil)-2-(2-cloro-acetilamino)-propiónico



Se añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (0,34 ml, 4,26 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 3 (1 g, 3,87 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,74 ml, 5,81 mmol) en DCM (35 ml) bajo nitrógeno a 0°C. Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 hora. Luego se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío produciendo el producto intermedio 4 (1,3 g, rendimiento del 89%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Ejemplo A5

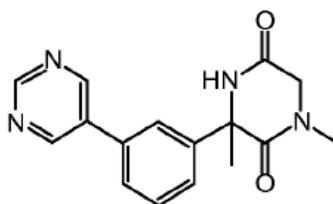
Preparación del producto intermedio 5: rac-3-(3-bromo-fenil)-1,3-dimetil-piperazin-2,5-diona



Se añadió metilamina al 33% en EtOH (5,36 ml, 43,04 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 4 (2,4 g, 7,17 mmol) en EtOH (53 ml) en un tubo sellado a temperatura ambiente. Luego, se agitó la mezcla a 70°C durante 3 horas. Se evaporó el disolvente a vacío produciendo el producto intermedio 5 (1,95 g, rendimiento del 88%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Ejemplo A6

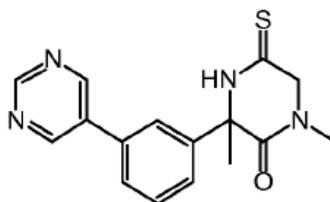
Preparación del producto intermedio 6: rac-1,3-dimetil-3-(3-pirimidin-5-ilfenil)-piperazin-2,5-diona



Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,023 g, 0,020 mmol) a una suspensión con agitación del producto intermedio 5 (0,3 g, 1,01 mmol) y ácido pirimidin-5-borónico (0,25 g, 2,02 mmol) en 1,4-dioxano (18 ml) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) (4 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 150°C durante 15 minutos con irradiación de microondas. Se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoníaco en metanol en DCM de 0/100 a 3/97). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 6 (0,26 g, rendimiento del 87%) como un sólido blanquecino.

#### Ejemplo A7

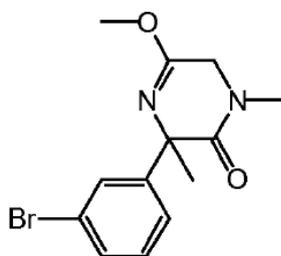
Preparación del producto intermedio 7: rac-1,3-dimetil-3-(3-pirimidin-5-ilfenil)-5-tioxopiperazin-2-ona



5 Se añadió reactivo de Lawesson (0,27 g, 0,66 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 6 (0,26 g, 0,60 mmol) y piridina (0,053 ml, 0,66 mmol) en tolueno (9 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 90°C durante 18 horas. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoniaco en metanol en DCM de 0/100 a 6/94). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 7 (0,17 g, rendimiento del 91%) como un sólido blanco.

#### 10 Ejemplo A8

Preparación del producto intermedio 8: rac-3-(3-bromo-fenil)-5-metoxi-1,3-dimetil-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona

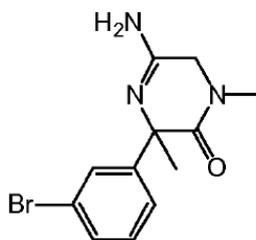


15 Se añadió tetrafluoroborato de trimetiloxonio (0,87 g, 5,89 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 5 (0,5 g, 1,68 mmol) en DCM (10 ml) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 60 horas. Luego se enfrió la mezcla hasta 0°C, se diluyó con NaHCO<sub>3</sub> enfriado con hielo (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío produciendo el  
20 producto intermedio 8 (0,51 g, rendimiento del 71%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Ejemplo A9

Preparación del producto intermedio 9: rac-5-amino-3-(3-bromo-fenil)-1,3-dimetil-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona

25



#### Método A

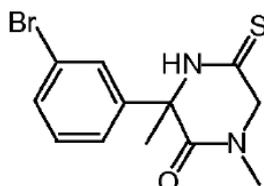
30 Se añadió cloruro de amonio (0,47 g, 8,77 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 8 (0,45 g, 1,46 mmol) en MeOH (15 ml) en un tubo sellado y bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 85°C durante 18 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se diluyó el residuo con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía de intercambio iónico usando un cartucho ISOLUTE® SCX2 (eluyendo  
35 en primer lugar con MeOH y luego con disolución 7 M de amoniaco en metanol). Se recogieron las fracciones deseadas eluidas con disolución 7 M de amoniaco en metanol y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 9 (0,16 g, rendimiento del 24%) como un aceite de color pardo.

## Método B

Se añadió una disolución acuosa de amoníaco al 32% (15 ml) al producto intermedio 10 (0,48 g, 1,53 mmol) y se agitó la mezcla en un tubo sellado a 50°C durante 18 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó el disolvente a vacío produciendo el producto intermedio 9 (0,45 g, rendimiento cuant.) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo A10

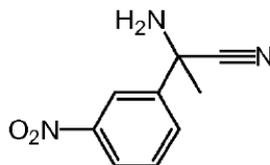
Preparación del producto intermedio 10: rac-3-(3-bromo-fenil)-1,3-dimetil-5-tioxopiperazin-2-ona



Se añadió reactivo de Lawesson (1,63 g, 4,04 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 5 (1,04 g, 3,36 mmol) y piridina (0,30 ml, 3,70 mmol) en tolueno (33 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 90°C durante 18 horas. Se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 4/96). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 10 (0,5 g, rendimiento del 47%) como un aceite incoloro.

Ejemplo A11

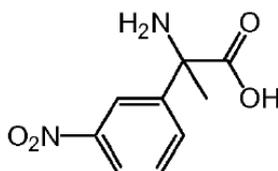
Preparación del producto intermedio 11: rac-2-amino-2-(3-nitro-fenil)-propionitrilo



Se sintetizó el producto intermedio 11 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A1. Partiendo de 1-(3-nitro-fenil)-etanonona (10 g, 60,55 mmol) se obtuvo el producto intermedio 11 como un sólido amarillo (10,2 g, rendimiento del 88%).

Ejemplo A12

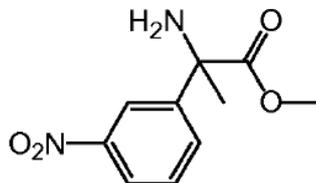
Preparación del producto intermedio 12: ácido rac-2-amino-2-(3-nitro-fenil)-propiónico



Se añadió el producto intermedio 11 (10,2 g, 53,07 mmol) a una disolución de HCl 6 N (79 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a reflujo durante 24 horas. Después de enfriarse, se añadieron agua (300 ml) y AcOEt (300 ml). Se separó la fase acuosa, se evaporó parcialmente a vacío y se neutralizó añadiendo una disolución acuosa de NaOH al 25%. Se enfrió la mezcla en un baño de hielo-agua y se retiró por filtración el precipitado, se lavó con agua fría seguido de Et<sub>2</sub>O y se secó a vacío produciendo el producto intermedio 12 (7 g, rendimiento del 63%) como un sólido blanco.

Ejemplo A13

Preparación del producto intermedio 13: éster metílico del ácido rac-2-amino-2-(3-nitro-fenil)-propiónico



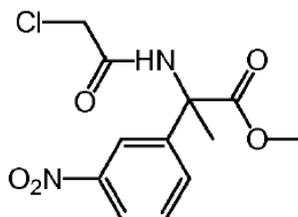
5

Se sintetizó el producto intermedio 13 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A3. Partiendo del producto intermedio 12 (6 g, 28,55 mmol) se obtuvo el producto intermedio 13 como un aceite incoloro (4 g, rendimiento del 63%).

10

Ejemplo A14

Preparación del producto intermedio 14: éster metílico del ácido 2-(2-cloro-acetilamino)-2-(3-nitro-fenil)-propiónico

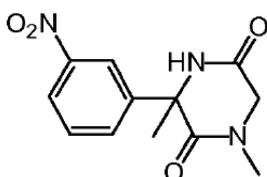


15

Se sintetizó el producto intermedio 14 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A4. Partiendo del producto intermedio 13 (1,65 g, 7,36 mmol) se obtuvo el producto intermedio 14 (2,2 g, rendimiento del 99%).

20 Ejemplo A15

Preparación del producto intermedio 15: rac-1,3-dimetil-3-(3-nitro-fenil)-piperazin-2,5-diona

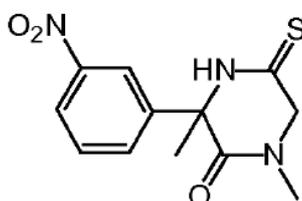


25

Se sintetizó el producto intermedio 15 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A5. Partiendo del producto intermedio 14 (2,2 g, 7,32 mmol) se obtuvo el producto intermedio 15 (1,92 g, rendimiento cuant.).

30 Ejemplo A16

Preparación del producto intermedio 16: rac-1,3-dimetil-3-(3-nitro-fenil)-5-tioxopiperazin-2-ona

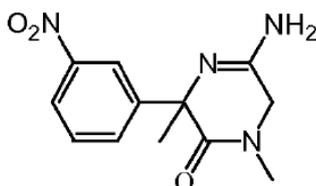


Se sintetizó el producto intermedio 16 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A10. Partiendo del producto intermedio 15 (1,92 g, 7 mmol) se obtuvo el producto intermedio 16 como un aceite incoloro (0,315 g, rendimiento del 16%).

5

Ejemplo A17

Preparación del producto intermedio 17: rac-5-amino-1,3-dimetil-3-(3-nitro-fenil)-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona



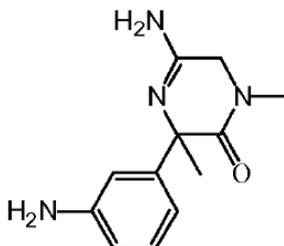
10

Se añadió una disolución acuosa de amoníaco al 32% (3 ml) a una mezcla del producto intermedio 16 (0,315 g, 1,13 mmol) en disolución 7 M de amoníaco en metanol (3 ml) y se agitó la mezcla en un tubo sellado a 67°C durante 4 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó el disolvente a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; MeOH en DCM de 1/99 a 7/93). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío. Se purificó de nuevo el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoníaco en metanol en DCM de 7/93 a 10/90). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 17 (0,11 g, rendimiento del 37%).

20

Ejemplo A18

Preparación del producto intermedio 18: rac-5-amino-3-(3-amino-fenil)-1,3-dimetil-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona



25

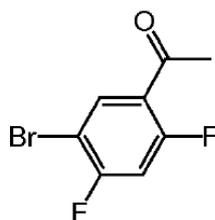
Se hidrogenó una disolución del producto intermedio 17 (0,46 g, 1,75 mmol) en EtOH (20 ml) y AcOEt (10 ml) en un reactor H-Cube (1 ml/min, cartucho de 30 mm de Pd/C al 5%, modo de H<sub>2</sub> total, temperatura ambiente, 1 ciclo). Luego, se evaporó el disolvente a vacío produciendo el producto intermedio 18 (0,41 g, rendimiento cuant.) como un sólido blanco.

30

Ejemplo A19

Preparación del producto intermedio 19: 1-(5-bromo-2,4-difluorofenil)-etanona

35

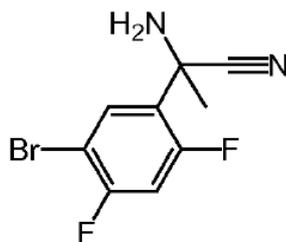


Se agitó una mezcla de AlCl<sub>3</sub> (200 g, 1515,1 mmol) en 1-bromo-2,4-difluoro-benceno (120 g, 621,79 mmol) a 60°C durante 10 minutos. Luego, se añadió gota a gota cloruro de acetilo (73 g, 929,9 mmol) a lo largo de 4 horas y se

agitó la mezcla a 95°C durante 6 horas. Se enfrió la mezcla a -10°C y se añadió hielo (300 g) a lo largo de 1 hora. Luego, se añadió AcOEt (500 ml) y se lavó con agua la fase orgánica separada, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; AcOEt en heptano 1/50). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 19 (60 g, rendimiento del 41%).

#### Ejemplo A20

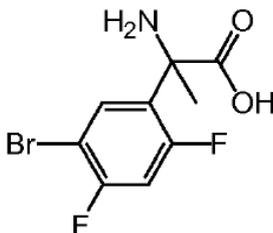
#### Preparación del producto intermedio 20: rac-2-amino-2-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-propionitrilo



Se sintetizó el producto intermedio 20 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A1. Partiendo del producto intermedio 19 (60 g, 255,31 mmol) se obtuvo el producto intermedio 20 (31 g, rendimiento del 47%).

#### Ejemplo A21

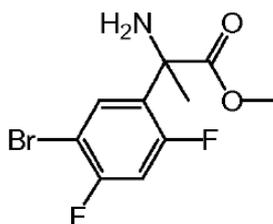
#### Preparación del producto intermedio 21 ácido rac-2-amino-2-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-propiónico



Se calentó a reflujo una mezcla del producto intermedio 20 (28 g, 107,65 mmol) y HCl 6 N (300 ml) en AcOH (300 ml) durante 72 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se evaporaron los disolventes a vacío. Se añadieron AcOEt (400 ml) y agua (300 ml). Se lavó con AcOEt (200 ml) la fase acuosa separada. Se separó la fase acuosa y se ajustó a pH = 7. Luego, se añadió AcOEt (250 ml). Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío produciendo el producto intermedio 21 (22 g, rendimiento del 72%).

#### Ejemplo A22

#### Preparación del producto intermedio 22: éster metílico del ácido rac-2-amino-2-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-propiónico

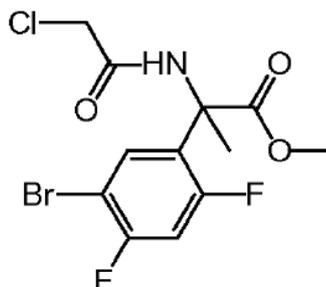


Se calentó a reflujo una mezcla del producto intermedio 21 (22 g, 78,55 mmol) en HCl 4 N en MeOH (400 ml) durante 72 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se evaporaron los disolventes a vacío. Se añadieron AcOEt (400 ml) y agua (300 ml). Se lavó con AcOEt (200 ml) la fase acuosa separada. Se separó la fase acuosa y se ajustó a pH = 7. Luego, se añadió AcOEt (250 ml). Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se

filtró y se evaporaron los disolventes a vacío produciendo el producto intermedio 22 (20 g, rendimiento del 87%).

#### Ejemplo A23

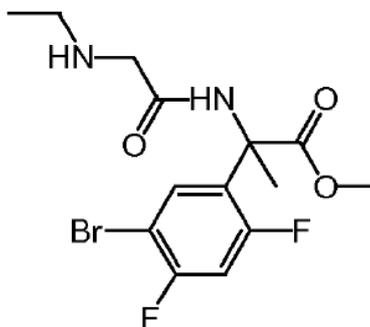
- 5 Preparación del producto intermedio 23: éster metílico del ácido rac-2-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-2-(2-cloroacetilamino)-propiónico



- 10 Se sintetizó el producto intermedio 23 siguiendo el mismo enfoque descrito en el ejemplo A4. Partiendo del producto intermedio 22 (4 g, 13,60 mmol) se obtuvo el producto intermedio 23 (5 g, rendimiento del 99%).

#### Ejemplo A24

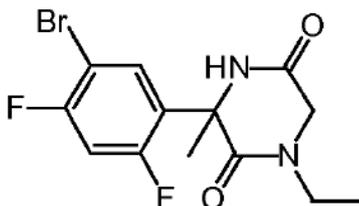
- 15 Preparación del producto intermedio 24: éster metílico del ácido rac-2-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-2-(2-etilaminoacetilamino)-propiónico



- 20 Se añadió etilamina 2 M en THF (4,05 ml, 8,1 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 23 (1 g, 2,7 mmol) en EtOH (12 ml) en un tubo sellado a temperatura ambiente. Luego, se agitó la mezcla a 70°C durante 3 horas. Se evaporó el disolvente a vacío produciendo el producto intermedio 24 (0,55 g, rendimiento del 54%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

#### Ejemplo A25

Preparación del producto intermedio 25: rac-3-(5-bromo-2,4-difluoro-fenil)-1-etil-3-metil-piperazin-2,5-diona

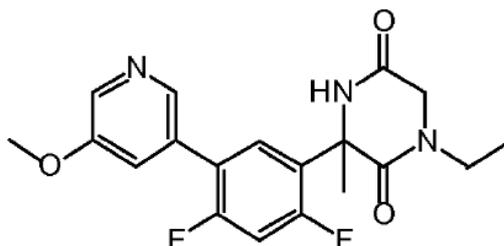


- 30 Se añadió AcOH (0,5 ml) a una disolución con agitación del producto intermedio 24 (0,55 g, 1,45 mmol) en EtOH

(25 ml) en un tubo sellado a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 95°C durante 16 horas. Luego, se diluyó la mezcla con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoniaco en metanol en DCM de 0/100 a 2/98). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 25 (0,33 g, rendimiento del 66%).

#### Ejemplo A26

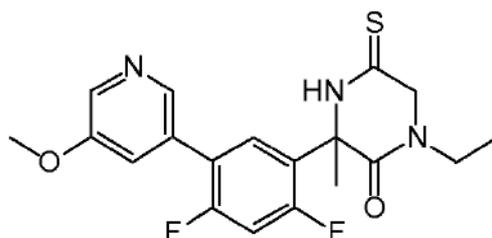
Preparación del producto intermedio 26: rac-3-[2,4-difluoro-5-(5-metoxi-piridin-3-il)-fenil]-etil-3-metil-piperazin-2,5-diona



Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0,022 g, 0,019 mmol) a una suspensión con agitación del producto intermedio 25 (0,33 g, 0,95 mmol) y ácido 3-metoxi-5-piridinborónico (0,19 g, 1,24 mmol) en 1,4-dioxano (12 ml) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) (4 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 150°C durante 15 minutos con irradiación de microondas. Se diluyó la mezcla con NaHCO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 11/89). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 26 (0,26 g, rendimiento del 73%) como un aceite incoloro.

#### Ejemplo A27

Preparación del producto intermedio 27: rac-3-[2,4-difluoro-5-(5-metoxi-piridin-3-il)-fenil]-1-etil-3-metil-5-tioxi-piperazin-2-ona

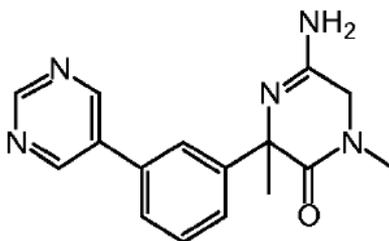


Se añadió reactivo de Lawesson (0,23 g, 0,57 mmol) a una disolución con agitación del producto intermedio 26 (0,26 g, 0,47 mmol) y piridina (0,046 ml, 0,57 mmol) en tolueno (9 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 90°C durante 18 horas. Luego, se añadió más reactivo de Lawesson (0,23 g, 0,57 mmol) y se calentó la mezcla resultante a 85°C durante 8 horas. Luego, se añadió más reactivo de Lawesson (0,30 g, 0,75 mmol) y se calentó la mezcla resultante a 85°C durante 16 horas. Se diluyó la mezcla con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y se extrajo con AcOEt. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 6/94). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el producto intermedio 27 (0,14 g, rendimiento del 76%).

#### B. Preparación de los compuestos finales

##### Ejemplo B1

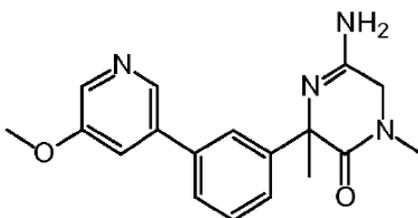
Preparación del compuesto 1: rac-5-amino-1,3-dimetil-3-(3-pirimidin-5-il-fenil)-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona



5 Se añadió una disolución acuosa de amoníaco al 32% (2 ml) al producto intermedio 7 (0,17 g, 0,54 mmol) y se agitó la mezcla en un tubo sellado a 65°C durante 2 horas y luego a 70°C durante 6 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó el disolvente a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoníaco en metanol en DCM de 0/100 a 6/94). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el compuesto 1 (0,09 g, rendimiento del 56%) como un sólido blanco.

#### Ejemplo B2

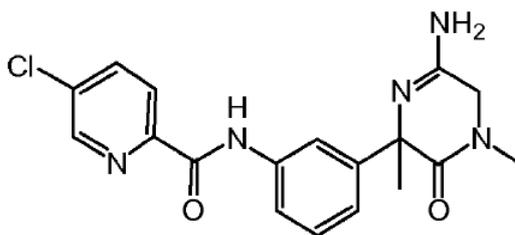
15 Preparación del compuesto 2: rac-5-amino-3-[3-(5-metoxi-piridin-3-il)-fenil]-1,3-dimetil-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona



20 Se añadió EtOH (3 ml) a una mezcla del producto intermedio 9 (0,16 g, 0,35 mmol), diacetato de trans-(bisdiciclohexilamina)paladio [DAPCy, CAS 628339-96-8] (0,021 g, 0,035 mmol), fosfato de potasio (0,22 g, 1,05 mmol) y éster de pinacol del ácido 3-metoxi-5-piridin-borónico (0,12 g, 0,53 mmol). Se agitó la mezcla a 80°C durante 48 horas. Después de enfriarse, se diluyó la mezcla con agua y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoníaco en metanol en DCM de 0/100 a 7/93). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío y se purificó de nuevo el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoníaco en metanol en DCM de 0/100 a 7/93). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el compuesto 2 (0,013 g, rendimiento del 11%).

#### Ejemplo B3

30 Preparación del compuesto 3: [3-(6-amino-2,4-dimetil-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-pirazin-2-il)-fenil]-amida del ácido rac-5-cloro-piridin-2-carboxílico



35

## Método A

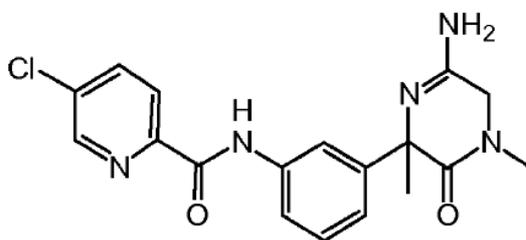
Se añadió trans-1,2-diaminociclohexano (0,002 g, 0,018 mmol) a una suspensión con agitación del producto intermedio 9 (0,052 g, 0,176 mmol), yoduro de cobre (I) (0,002 g, 0,009 mmol), 5-cloro-2-piridincarboxamida (0,028 g, 0,176 mmol) y fosfato de potasio tribásico (0,075 g, 0,351 mmol) en DMF (1 ml) en un tubo sellado y bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a 180°C durante 140 minutos con irradiación de microondas. Se diluyó la mezcla con NH<sub>4</sub>Cl (disol. acuosa sat.) y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; disolución 7 M de amoniaco en metanol en DCM de 0/100 a 1/99). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el compuesto 3 (0,004 g, rendimiento del 6%).

## Método B

Se añadió ácido 5-cloro-2-piridincarboxílico (0,234 g, 1,485 mmol) a una suspensión del producto intermedio 18 (0,3 g, 1,292 mmol) en DCM (13 ml) a temperatura ambiente. Luego, se añadió *N,N*-dimetilanilina (0,21 ml, 1,679 mmol) y después de agitarse a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadió HATU (0,54 g, 1,421 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; metanol en DCM de 0/100 a 10/90). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el compuesto 3 (0,294 g, rendimiento del 61%).

## Ejemplo B4

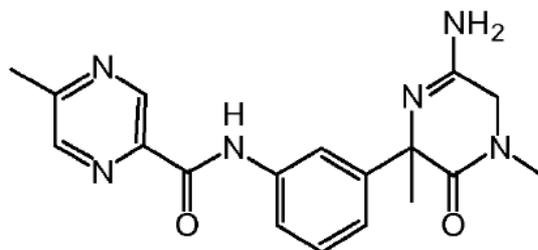
Preparación del compuesto 4: [3-(6-amino-2,4-dimetil-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidropirazin-2-il)-fenil]-amida del ácido (S\*)-5-cloro-piridin-2-carboxílico y compuesto 5 [3-(6-amino-2,4-dimetil-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidropirazin-2-il)-fenil]-amida del ácido (R\*)-5-cloro-piridin-2-carboxílico



Se separó una muestra del compuesto 3 (294 mg) en los enantiómeros correspondientes mediante CFS preparativa en columna Chiralcel® OD-H (5 μm 250 x 20 mm), fase móvil (el 0,3% de isopropil-amina, el 60% de CO<sub>2</sub>, el 40% de mezcla de EtOH/iPrOH 50/50 v/v), produciendo el compuesto 4 (0,11 g) y el compuesto 5 (0,15 g). Se purificó de nuevo este último derivado mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; el 0,5% de NH<sub>4</sub>OH, el 95% de DCM, el 5% de EtOH) produciendo el compuesto 5 puro (0,09 g).

## Ejemplo B5

Preparación del compuesto 6: [3-(6-amino-2,4-dimetil-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidropirazin-2-il)-fenil]-amida del ácido rac-5-metil-pirazin-2-carboxílico

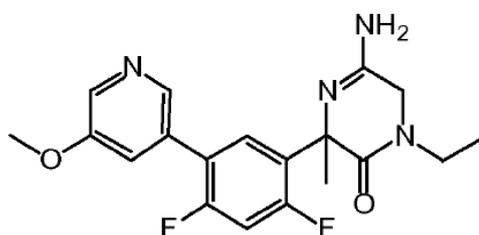


Se añadió ácido 5-metilpirazin-2-carboxílico (0,014 g, 0,104 mmol) a una suspensión del producto intermedio 18

(0,021 g, 0,09 mmol) en DCM (1,5 ml) a temperatura ambiente. Luego, se añadió piridina (0,01 ml, 0,118 mmol) y después de agitarse a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadió HATU (0,038 g, 0,099 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas. Se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporaron los disolventes a vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 10/90). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío. Se purificó de nuevo el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice; inyección de sólido; disolución 7 M de amoniaco en metanol en DCM de 0/100 a 2/98). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron a vacío produciendo el compuesto 6 (0,009 g, rendimiento del 28%).

#### Ejemplo B6

Preparación del compuesto 9: rac-5-amino-3-[2,4-difluoro-5-(5-metoxi-piridin-3-il)-fenil]-etil-3-metil-3,6-dihidro-1H-pirazin-2-ona



Se añadió una disolución acuosa de amoniaco al 32% (8 ml) a una disolución del producto intermedio 27 (0,14 g, 0,36 mmol) en disolución 7 M de amoniaco en metanol (4 ml) y se agitó la mezcla en un tubo sellado a 65°C durante 3 horas. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con agua y se extrajo con DCM. Se separó la fase orgánica, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se evaporó el disolvente a vacío produciendo el compuesto 9 (0,12 g, rendimiento del 90%) como un sólido blanco.

Tabla 1

N.º de comp.	N.º de ej.	---R <sup>3</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	---L-Ar	Estereoquímica de C <sub>3</sub>
1	B1	---Me	CH	CH		RS
2	B2	---Me	CH	CH		RS
3	B3	---Me	CH	CH		RS
4	B4	---Me	CH	CH		S*

5	B4	---Me	CH	CH		R*
6	B5	---Me	CH	CH		RS
7	B5	---Me	CH	CH		RS
8	B5	---Me	CH	CH		RS
9	B6	---Et	CF	CF		RS

### C. Parte analítica

CL-EM

5

Para la caracterización (CL)EM de los compuestos de la presente invención, se usaron los siguientes métodos.

#### Procedimiento general A:

- 10 Se realizó la medición de UPLC (cromatografía de líquidos de resolución ultra-alta) usando un sistema Acquity UPLC (Waters) que comprende un organizador de muestras, una bomba binaria con desgasificador, un horno de cuatro columnas, un detector por red de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos. Se configuró el detector de EM con una fuente de ionización dual ESCI (electropulverización combinada con ionización química a presión atmosférica). Se usó nitrógeno como el gas nebulizador. Se mantuvo la temperatura de la fuente a 140°C. Se realizó la adquisición de datos con el software MassLynx-Openlynx.
- 15

#### Método 1:

- 20 Además del procedimiento general A: se llevó a cabo UPLC de fase inversa en una columna BEH-C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm) de Waters, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min, a 50°C sin fraccionamiento al detector de EM. Las condiciones de gradiente usadas son: el 95% de A (disolución de acetato de amonio 0,5 g/l + el 5% de acetonitrilo), el 5% de B (acetonitrilo), hasta el 40% de A, el 60% de B en 3,8 minutos, hasta el 5% de A, el 95% de B en 4,6 minutos, se mantiene hasta 5,0 minutos. Volumen de inyección de 2 µl. Se adquirieron los espectros de masa de baja resolución (detector SQD, un solo cuadrupolo) mediante barrido desde 100 hasta 1000 en 0,1 segundos usando un retardo entre canales de 0,08 segundos. El voltaje de la aguja capilar era de 3 kV. El voltaje del cono era de 25 V para el modo de ionización positiva y de 30 V para el modo de ionización negativa.
- 25

#### Procedimiento general B:

- 30 Se realizó la medición de CL usando un sistema Acquity UPLC (cromatografía de líquidos de resolución ultra-alta) (Waters) que comprende una bomba binaria con desgasificador, un inyector automático, un detector por red de diodos (DAD) y una columna tal como se especifica en los métodos respectivos a continuación, se mantiene la columna a una temperatura de 40°C. Se llevó el flujo de la columna hasta un detector de EM. Se configuró el detector de EM con una fuente de ionización por electropulverización. El voltaje de la aguja capilar era de 3 kV y la temperatura de la fuente se mantuvo a 130°C en el instrumento Quattro (espectrómetro de masas de triple
- 35

cuadrupolo de Waters). Se usó nitrógeno como el gas nebulizador. Se realizó la adquisición de datos con el software MassLynx-Openlynx (Waters).

#### Método 2:

5 Además del procedimiento general B: se llevó a cabo UPLC de fase inversa en una columna Acquity BEH (híbrido de etilsiloxano/sílice unidos por puentes) Phenyl-Hexyl de Waters (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm) con una velocidad de flujo de 0,343 ml/min. Se emplearon dos fases móviles (fase móvil A: el 95% de acetato de amonio 7 mM/el 5% de acetonitrilo; fase móvil B: el 100% de acetonitrilo) para ejecutar una condición de gradiente de desde el 84,2% de A y el 15,8% de B (mantenido durante 0,49 minutos) hasta el 10,5% de A y el 89,5% de B en 2,18 minutos, mantenido durante 1,94 min y de vuelta a las condiciones iniciales en 0,73 min, mantenido durante 0,73 minutos. Se usó un volumen de inyección de 2 ml. El voltaje del cono era de 20 V para el modo de ionización positiva y negativa. Se adquirieron los espectros de masa mediante barrido desde 100 hasta 1000 en 0,2 segundos usando un retardo entre barridos de 0,1 segundos.

#### Puntos de fusión

Los valores son o bien valores pico o bien intervalos de fusión, y se obtienen con las incertidumbres experimentales que se asocian comúnmente con este método analítico.

#### Aparato Mettler FP81HT/FP90 (indicado mediante FP90 en la tabla 2)

Para varios compuestos, se determinaron los puntos de fusión en tubos capilares abiertos en un aparato FP81HT/FP90 de Mettler. Se midieron los puntos de fusión con un gradiente de temperatura de 1, 3, 5 ó 10°C/minuto. La temperatura máxima fue de 300°C. Se leyó el punto de fusión de una pantalla digital.

Tabla 2: Datos analíticos -  $R_t$  significa tiempo de retención (en minutos),  $[M+H]^+$  significa la masa protonada del compuesto, el método se refiere al método usado para (CL)EM.

N.º de comp.	$R_t$	$[M+H]^+$	Método	Punto de fusión
1	0,44	296	1	223,4°C (FP90)
2	0,91	325	1	n.d.
3	1,22	372	1	148,1°C (FP90)
4	2,06	372	2	201,3°C (FP90)
5	2,06	372	2	218,5°C (FP90)
6	0,69	353	1	n.d.
7	0,84	363	1	n.d.
8	1,59	406	1	n.d.
9	1,14	375	1	81,8°C (FP90)

n.d. significa no determinado

#### CFS-EM

#### Procedimiento general

35 Se realizó la medición de CFS usando un sistema CFS analítico de Berger instruments (Newark, DE, EE.UU.) que comprende un módulo de control de fluido de bomba dual FCM-1200 para suministrar dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y modificador, un muestreador líquido automático de CTC Analytics, un módulo de control térmico TCM-20000 para el calentamiento de la columna desde temperatura ambiente hasta 80°C. Se usó un detector por red de fotodiodos 1100 UV de Agilent equipado con una celda de flujo a alta presión que se eleva hasta 400 bar. Se fraccionó el flujo de la columna a un espectrómetro de EM. Se configuró el detector de EM con una fuente de ionización a presión atmosférica. Los parámetros de ionización siguientes para el espectrofotómetro de masas ZQ de Waters son: descarga corona: 9  $\mu\text{A}$ , temp. de la fuente: 140°C, cono: 30 V, temp de la sonda 450°C, extractor 3 V, gas de desolvatación 400 l/h, gas del cono 70 l/h. Se usó nitrógeno como el gas nebulizador. Se realizó la adquisición de datos con un sistema de datos MassLynx-Openlynx de Waters-Micromass.

#### Método 1:

50 Además del procedimiento general: se llevó a cabo la separación quiral en CFS en una columna Chiralcel® OD DAICEL (10  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm) a 35°C con una velocidad de flujo de 3,0 ml/min. La fase móvil es  $\text{CO}_2$ , etanol al 40%/isopropanol (1/1) (que contiene el 0,3% de  $i\text{PrNH}_2$ ) mantenido 7 min.

Tabla 3: Datos de CFS analíticos -  $R_t$  significa tiempo de retención (en minutos),  $[M+H]^+$  significa la masa protonada del compuesto, el método se refiere al método usado para el análisis de (CFS)EM de compuestos enantioméricamente puros.

N.º de comp.	Rt	[M+H] <sup>+</sup>	% de área UV	Método	Orden de elución de isómeros
4	4,41	372	100	1	A
5	5,47	372	100	1	B

#### Rotaciones ópticas

- 5 Se midieron las rotaciones ópticas en un polarímetro 341 de Perkin-Elmer con una lámpara de sodio y se notificaron tal como sigue:  $[\alpha]_{\lambda}^{t^{\circ}\text{C}}$  (cg/100 ml, disolvente).

Tabla 4: Datos analíticos - valores de rotación óptica para compuestos enantioméricamente puros

N.º de comp.	$a_D$ (º)	Longitud de onda (nm)	Concentración %p/v	Disolvente	Temp. (ºC)
4	+45,3	589	0,72	DMF	20
5	-45,7	589	0,49	DMF	20

10

#### D. Ejemplos farmacológicos

- 15 Los compuestos proporcionados en la presente invención son inhibidores de la enzima de escisión de APP en el sitio beta 1 (BACE1). Se cree que la inhibición de BACE1, una proteasa aspártica, es relevante para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se cree que la producción y acumulación de péptidos beta-amiloideos (Abeta) de la proteína precursora de beta-amiloide (APP) desempeña un papel clave en la aparición y progresión de EA. Abeta se produce a partir de la proteína precursora amiloide (APP) mediante escisión secuencial en los extremos N- y C-terminal del dominio Abeta por la beta-secretasa y la gamma-secretasa, respectivamente.

- 20 Se espera que los compuestos de fórmula (I) tengan su efecto sustancialmente en BACE1 en virtud de su capacidad para inhibir la actividad enzimática. Se sometieron a prueba los inhibidores usando un ensayo basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) bioquímico y un ensayo  $\alpha$ Lisa celular en células SKNBE2 tal como se describe a continuación. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6.

#### 25 Ensayo basado en FRET bioquímico

- 30 Este ensayo es un ensayo basado en el ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El sustrato para este ensayo es un péptido de 13 aminoácidos derivado de APP que contiene la mutación "Swedish" Lys-Met/Asn-Leu del sitio de escisión por beta-secretasa de la proteína precursora amiloide (APP). Este sustrato también contiene dos fluoróforos: el ácido (7-metoxicumarin-4-il)acético (Mca) es un donador fluorescente con longitud de onda de excitación a 320 nm y de emisión a 405 nm y 2,4-dinitrofenilo (Dnp) es un aceptor de extinción patentado. La distancia entre esos dos grupos se ha seleccionado de manera que tras excitación con luz, la energía de fluorescencia del donador se extingue significativamente por el aceptor, a través de la transferencia de energía por resonancia. Con la escisión por BACE1, el fluoróforo Mca se separa del grupo de extinción Dnp, restableciendo la producción de fluorescencia total del donador. El aumento en la fluorescencia está relacionado linealmente con la tasa de proteólisis.

- 40 Brevemente, en un formato de 384 pocillos se incubó proteína BACE1 recombinante en una concentración final de 1  $\mu$ g/ml durante 120 minutos a temperatura ambiente con sustrato 10  $\mu$ M en tampón de incubación (tampón citrato 40 mM, pH 5,0, PEG al 0,04%, DMSO al 4%) en ausencia o presencia del compuesto. A continuación se mide directamente la cantidad de proteólisis mediante la medición de fluorescencia a T=0 y T=120 (excitación a 320 nm y emisión a 405 nm). Se expresan los resultados en UFR (unidades de fluorescencia relativa), como la diferencia entre T120 y T0.

- 45 Se ajusta una curva de ajuste óptimo mediante un método de suma mínima de cuadrados al gráfico de % de controlmin frente a la concentración del compuesto. A partir de esto, puede obtenerse un valor de CI50 (concentración inhibitoria que provoca el 50% de inhibición de la actividad).

50 LC = mediana de los valores de control bajos

= control bajo: reacción sin enzima

HC = mediana de los valores de control altos

55 = control alto: reacción con enzima

% de efecto =  $100 - [(muestra-LC)/(HC-LC) * 100]$

% de control = (muestra/HC)\*100

% de controlmin = (muestra-LC)/(HC-LC)\*100

5 Se sometieron a prueba los siguientes compuestos ejemplificados esencialmente tal como se describió anteriormente y presentaron la siguiente actividad:

10 Tabla 5

N.º de comp.	pCl <sub>50</sub> del ensayo basado en FRET bioquímico
1	4,69
2	4,98
3	6,11
4	< 4,52
5	6,49
6	5,15
7	6,09
8	5,86
9	< 4,52

*Ensayo αLisa celular en células SKNBE2*

15 En dos ensayos αLisa, se cuantifican los niveles de Abeta total y Abeta 1-42 producidos y secretados en el medio de células SKNBE2 de neuroblastoma humano. El ensayo se basa en el neuroblastoma humano SKNBE2 que expresa la proteína precursora amiloide de tipo natural (hAPP695). Se diluyen los compuestos y se añaden a estas células, se incuban durante 18 horas y luego se toman las mediciones de Abeta 1-42 y Abeta total. Se miden Abeta total y Abeta 1-42 mediante αLisa de tipo sándwich. αLisa es un ensayo de tipo sándwich que usa anticuerpo biotinilado AbN/25 unido a perlas recubiertas con estreptavidina y anticuerpo Ab4G8 o perlasceptoras conjugadas con cAb42/26 para la detección de Abeta total y Abeta 1-42, respectivamente. En presencia de Abeta total o Abeta 1-42, las perlas entran en estrecha proximidad. La excitación de las perlas donadoras provoca la liberación de moléculas de oxígeno singlete que desencadenan una cascada de transferencia de energía en las perlasceptoras, que da como resultado emisión de luz. Se mide la emisión de luz tras incubación durante 1 hora (excitación a 650 nm y emisión a 615 nm).

25 Se ajusta una curva de ajuste óptimo mediante un método de suma mínima de cuadrados al gráfico de % de controlmin frente a la concentración del compuesto. A partir de esto, puede obtenerse un valor de CI50 (concentración inhibitoria que provoca el 50% de inhibición de la actividad).

30 LC = mediana de los valores de control bajos

= control bajo: células preincubadas sin compuesto, sin Ac biotinilado en αlisa

35 HC = mediana de los valores de control altos

= control alto: células preincubadas sin compuesto

% de efecto = 100-[(muestra-LC)/(HC-LC)\*100]

40 % de control = (muestra/HC)\*100

% de controlmin = (muestra-LC)/(HC-LC)\*100

45 Se sometieron a prueba los siguientes compuestos ejemplificados esencialmente tal como se describió anteriormente y presentaron siguiente la actividad:

Tabla 6

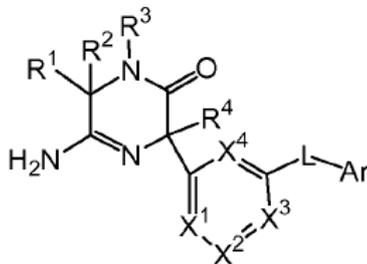
N.º de comp.	pCl <sub>50</sub> de Aβ42 del ensayo αlisa celular en células SKNBE2	pCl <sub>50</sub> de Aβtotal del ensayo αlisa celular en células SKNBE2
1	5,35	5,41
2	5,78	5,82
3	7,19	7,56
4	< 5	< 5

# ES 2 459 593 T3

5	7,44	7,43
6	5,90	5,94
7	6,73	6,82
8	7,17	7,10
9	< 5	5,04

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

o una forma estereoisomérica del mismo, en la que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> son hidrógeno;

10

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> son independientemente metilo o etilo;

X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> son CH o CF;

15

X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> son CH;

L es un enlace o -N(R<sup>6</sup>)CO- en el que R<sup>6</sup> es hidrógeno;

Ar es heteroarilo;

20

heteroarilo se selecciona del grupo que consiste en piridilo, pirimidinilo y pirazilo, cada uno opcionalmente sustituido con cloro, ciano, metilo, metoxilo o trifluorometilo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

25

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> son hidrógeno;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> son metilo;

30

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup>, X<sup>4</sup> son CH;

L es -N(R<sup>6</sup>)CO- en el que R<sup>6</sup> es hidrógeno;

Ar es heteroarilo;

35

heteroarilo es piridilo sustituido con cloro, ciano, metoxilo o trifluorometilo, pirimidinilo o pirazilo sustituido con metilo.

3. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 ó 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.

40

4. Procedimiento para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizado porque un portador farmacéuticamente aceptable se mezcla de manera íntima con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 ó 2.

45

5. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento, la prevención o la profilaxis de enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve, senilidad, demencia, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, demencia asociada con accidente cerebrovascular, demencia asociada con enfermedad de Parkinson o demencia asociada con beta-amiloide.