(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 802 977**

(51) Int. Cl.:

C07D 413/10	(2006.01)	***A61P 19/04***	(2006.01)
A61K 31/4245	(2006.01)	***A61P 17/06***	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)	***A61P 9/10***	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	***A61P 35/00***	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)	***A61P 31/12***	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)	***A61P 3/10***	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)		
A61P 11/06	(2006.01)		
A61P 37/06	(2006.01)		
A61P 1/04	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2014** **PCT/CN2014/086538**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15039587**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2014** **E 14846294 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3048103**

(54) Título: **Compuesto para la modulación inmunológica, uso del mismo y composición farmacéutica que lo comprende**

(30) Prioridad:

22.09.2013 CN 201310433018

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2021

(73) Titular/es:

SUZHOU CONNECT BIOPHARMACEUTICALS, LTD. (100.0%)
3rd Floor, East R&D Building, Science & Technology Park, No.6 Beijing West Road, Taicang
Jiangsu, 215400, CN

(72) Inventor/es:

ZHENG, WEI;
PAN, WUBIN y
YANG, XIN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 802 977 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 para la modulación inmunológica, uso del mismo y composición farmacéutica que lo comprende

Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la medicina. En particular, la presente invención se refiere a un compuesto novedoso que tiene actividad de agonista de receptor S1P1, una composición farmacéutica que comprende el compuesto. En la presente memoria se divulga también el uso del compuesto y una composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades con mediación del receptor S1P1. En la presente memoria también se divulga el uso del compuesto y la composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con mediación del receptor S1P1.

Antecedentes de la invención

También se sabe en la técnica que se requiere la presencia del receptor-1 de esfingosin-1-fosfato (S1P1) para el transporte de linfocitos desde los tejidos linfáticos al interior de la circulación periférica. No obstante, la internalización de S1P1 puede evitar que los linfocitos salgan de los tejidos linfáticos, y con ello esos inmunocitos importantes quedan confinados en los tejidos linfáticos.

Muchos estudios sugirieron que existen múltiples agonistas S1P1 que se pueden unir a los receptores homólogos expresados sobre linfocitos y que tienen como resultado la internalización de S1P1, evitando de este modo el transporte de linfocitos. Los agonistas del receptor S1P1 pueden reducir la capacidad del ser humano para iniciar la respuesta inmunológica evitando el transporte de linfocitos, por tanto, pueden servir como inmunosupresores para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunológicas.

Se han descrito muchos agonistas S1P1 y el compuesto más típico entre ellos es FTY720 (también conocido como “Fingolimod”). Ahora, FTY720 es facilitado y comercializado por Novartis con el nombre comercial “Gilenya”, para el tratamiento de esclerosis múltiple. Aunque FTY720 tenga eficacia clínica, es un agonista del receptor S1P no selectivo y puede activar varios receptores S1P, tales como S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5. La unión de FTY720 a S1P3 puede ser el resultado de una serie de efectos secundarios, por ejemplo, bradicardia y fibrosis tisular. Por tanto, muchas compañías farmacéuticas y grupos biotecnológicos están indagando acerca de una segunda generación de agonistas S1P1 que sean más específicos y más seguros, para solucionar los efectos secundarios de FTY720.

Además de mejorar la especificidad de la diana, el acortamiento de la semivida del fármaco (es decir, el agonista del receptor S1P1) es otro objetivo importante de evaluación de la segunda generación de agonistas S1P1 (Pan et al., 2013, ACS Medicinal Chemistry Letters, 4, p333). Tradicionalmente, se considera que los fármacos de molécula pequeña con semivida prolongada resultan deseables, ya que una semivida prolongada puede evitar la administración frecuente del fármaco. No obstante, una semivida prolongada se puede convertir en una seria desventaja para los fármacos inmunosupresores debido a que el fármaco inmunosupresor puede inhibir de manera persistente el transporte de linfocitos, y con ello disminuir el número de linfocitos en la sangre periférica, dando como resultado un funcionamiento inmunológico reducido y un mayor riesgo de infecciones víricas para los usuarios del fármaco. La desventaja anterior existe con el agonista del receptor S1P1, tal como FTY720, clínicamente usado en la actualidad. En caso de infección, con frecuencia se requiere para administración discontinua, con el fin de lograr que los linfocitos de la sangre periférica vuelvan a un nivel normal tan pronto como resulte posible y se restaure la función inmunológica del cuerpo humano de manera rápida. Debido a que la semivida de FTY720 en el cuerpo es de 6 a 9 días, se requiere un tiempo prolongado para que los linfocitos reviertan a su valor normal incluso después de que los pacientes dejen de tomar el medicamento (Budde et al., 2002, Journal of the American Society of Nephrology, 13: 1073-83).

Por tanto, existe la necesidad de un agonista de receptor S1P1 novedoso con elevada selectividad por S1P1 y semivida más corta, con el fin de solucionar las deficiencias de las terapias existentes.

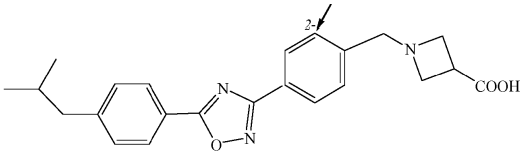
La solicitud de patente internacional WO 03/105771 divulga 1-((5-aril-1,2,4-oxasiazol-3-il)bencilacetidin-3-carboxilatos y 1-((5-aril-1,2,4-oxa-diazol-3-il)bencil)pirrolidin-3-carboxilatos como agonistas del receptor Edg, así como también sales farmacéuticamente aceptables y sus hidratos. Los compuestos son útiles para el tratamiento de afecciones y enfermedades con mediación inmunológica, tales como rechazo de trasplante tisular, órganos o médula ósea.

La solicitud de patente CN103450171 proporciona una síntesis de un compuesto que comprende un grupo que es un halógeno o un alquilo C1-C6 y que tiene actividad de agonista de receptor S1P1, selectividad y especificidad. Se purifica un compuesto intermedio de la síntesis usando cromatografía en columna.

Sumario de la invención

Con el fin de solucionar los problemas técnicos anteriores, los inventores llevaron a cabo la síntesis química farmacéutica, y evaluaron un gran número de compuestos sintetizados a través de estudios toxicológicos en ratas en combinación con estudios sobre regulación de inmunocitos y similares. Se encontró durante los estudios que es posible obtener compuestos novedosos mediante la adición de un halógeno o alquilo a la posición 2 del compuesto, tal y como se conoce en la Fórmula IA, que se ha descrito como ácido 1-{4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-

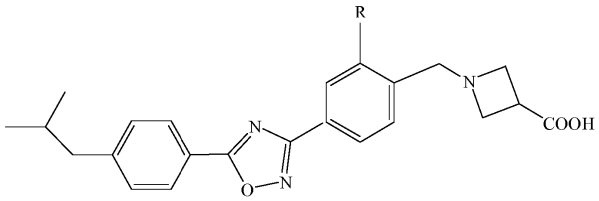
bencil}-3-acetidin carboxílico (Li et al., 2005, Journal of Medicinal Chemistry, 48 (20) 6169-6173; también conocido como “Compuesto 1” en la presente memoria). Esos compuestos retuvieron la potencia de regulación inmunológica in vitro e in vivo tras administración oral e intravenosa, y adicionalmente los compuestos obtenidos a través de sustitución por halógeno también presentan una semivida obviamente reducida tras la administración de dos formas diferentes.



Fórmula IA (Compuesto 1)

Por tanto, una finalidad de la presente invención es proporcionar un compuesto novedoso, para solucionar la deficiencia de selectividad y semivida de los agonistas existentes de receptor S1P1. Otra finalidad dentro del contexto de la presente invención es proporcionar un uso del compuesto para la preparación de un medicamento. Otra finalidad de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el compuesto como principio activo principal. Otra finalidad dentro del contexto de la presente invención consiste en proporcionar un compuesto o composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad. Otra finalidad de la presente invención es proporcionar un método de síntesis del compuesto. Con el fin de llevar a cabo los objetivos anteriores, las soluciones técnicas proporcionadas por medio de la presente invención son las siguientes:

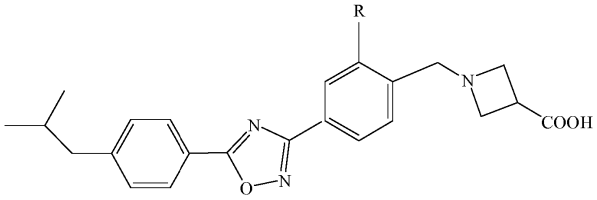
En la presente memoria, se describe un compuesto que se muestra en la Fórmula I,



Fórmula I

en la que R es halógeno o alquilo C_1-C_6.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I

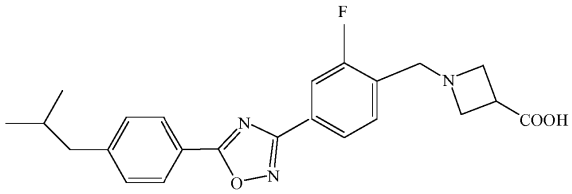


Fórmula I

en la que R es halógeno.

Preferentemente, de acuerdo con las realizaciones de la invención R es F, Cl, o Br; también se divulga en la presente memoria que R sea alquilo C1-C3 (no de acuerdo con la invención), más preferentemente metilo (no de acuerdo con la invención).

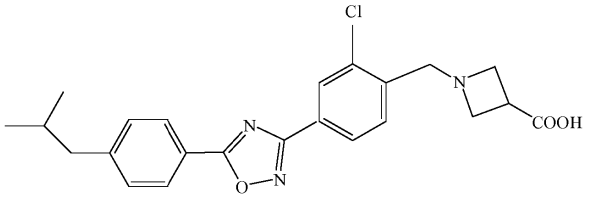
El compuesto es, cuando R es F, ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (también conocido como “Compuesto 2” en la presente memoria), que viene representado por la Fórmula IB:



Fórmula IB (Compuesto 2)

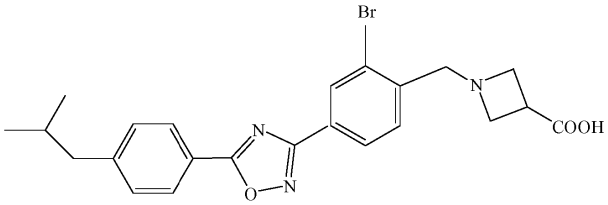
El compuesto es, cuando R es Cl, ácido 1-{2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin

carboxílico (también conocido como “Compuesto 3” en la presente memoria), que viene representado por la Fórmula IC:



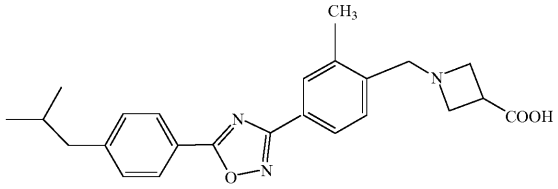
Fórmula IC (Compuesto 3)

El compuesto es, cuando R es Br, ácido 1-{2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (también conocido como “Compuesto 4” en la presente memoria), que viene representado por la Fórmula ID:



Fórmula ID (Compuesto 4)

El compuesto es, cuando R es metilo, ácido 1-{2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (también conocido como “Compuesto 5” en la presente memoria), que viene representado por la Fórmula IE (no de acuerdo con la invención):



Fórmula IE (Compuesto 5; no de acuerdo con la invención)

Un gran número de experimentos mostró que los compuestos proporcionados por medio de la presente invención tuvieron actividad agonista S1P1, que se confirmó por medio de la internalización detectada de S1P1 y el número reducido de linfocitos en sangre periférica inducido por los compuestos. Al mismo tiempo, los compuestos proporcionados por la presente invención tuvieron una especificidad selectiva para S1P1; especialmente los compuestos no indujeron la internalización de células que expresan el subtipo S1P3. Además, los experimentos farmacocinéticos de los compuestos proporcionados por medio de la presente invención mostraron que la semivida de determinados compuestos se acortó significativamente en comparación con la del compuesto representado por medio de la Fórmula IA, y fue mucho más corta que la de FTY720.

Por tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de los compuestos anteriores para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección o enfermedad con mediación de S1P1. Por consiguiente, la presente invención también se refiere al compuesto de la invención para su uso en el tratamiento de una afección o enfermedad con mediación de S1P1. En particular, dicha afección o enfermedad está seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enteritis inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria crónica, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumor sólido, enfermedad asociada a angiogénesis, enfermedad de los vasos sanguíneos, dolor, enfermedad vírica aguda, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente o no dependiente de insulina y otras enfermedades inmunológicas relacionadas. Preferentemente, dicha afección o enfermedad está seleccionada entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enteritis inflamatoria y soriasis.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos “tratar” o “tratamiento” también se refieren a evitar las afecciones o enfermedades anteriores o retardar los síntomas y similares, a partir de la curación de afecciones o

enfermedades con mediación de S1P1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto proporcionado por medio de la presente invención y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una formulación medicinal en sí misma, o se puede preparar como formulación médica o formulación medicinal combinada con otro(s) excipiente(s) o fármaco(s).

Específicamente, la composición farmacéutica proporcionada por medio de la presente invención puede estar en forma de un comprimido, supositorio, comprimido dispersable, comprimido entérico revestido, comprimido masticable, comprimido de desintegración oral, cápsula, agente revestido con azúcar, gránulo, polvo seco, disolución oral, aguja pequeña para inyección, polvo liofilizado o disolución parenteral de gran volumen para inyección; preferentemente el vehículo farmacéuticamente aceptable está seleccionado entre el grupo que consiste en diluyentes, agentes de disolución, agentes desintegrantes, agentes de suspensión, lubricantes, aglutinantes, materiales de relleno, agentes aromatizantes, edulcorantes, antioxidantes, tensioactivos, conservantes, agentes de envasado y pigmentos, etc.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de una afección o enfermedad con mediación de S1P1, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o la composición farmacéutica de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención también se refiere al compuesto de la invención o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una afección o enfermedad con mediación de S1P1, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o composición farmacéutica. Preferentemente, dicho sujeto es un mamífero.

De acuerdo con las realizaciones de la invención, dicha afección o enfermedad está seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enteritis inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria crónica, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumor sólido, enfermedad asociada a angiogénesis, enfermedad de los vasos sanguíneos, dolor, enfermedad vírica aguda, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente o no dependiente de insulina y otras enfermedades inmunológicas relacionadas. Preferentemente, dicha afección o enfermedad está seleccionada entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enteritis inflamatoria y soriasis.

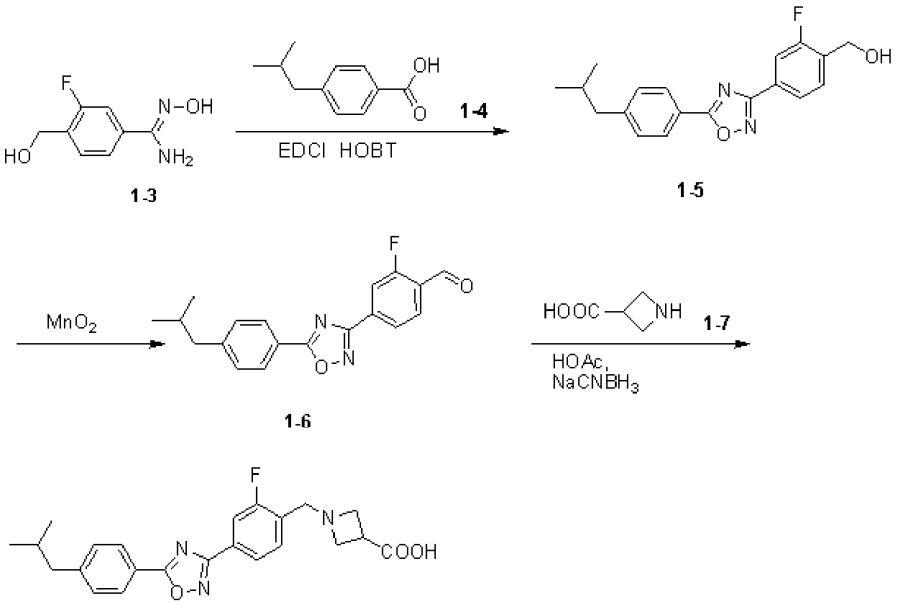
El compuesto o la composición farmacéutica proporcionados por medio de la presente invención se pueden co-administrar con otras terapias o agentes terapéuticos. Lo que es más, las dosis del compuesto o la composición farmacéutica necesarias para desempeñar el papel de tratamiento, prevención o retardo dependen del compuesto particular a administrar, el paciente, la enfermedad o trastorno específico y la gravedad del mismo, la ruta y frecuencia de administración y similares, y se debe determinar por parte del doctor responsable de la atención de acuerdo con condiciones específicas.

En resumen, la presente invención proporciona un compuesto novedoso que tiene una actividad de agonista de S1P1, y el compuesto se obtiene por medio de sustitución en la posición 2 del compuesto representado por medio de la Fórmula IA con halógeno, especialmente flúor, cloro o bromo. Se puede demostrar que los compuestos de la presente invención tienen la actividad de agonista de S1P1 mediante internalización detectada por vía experimental de S1P1 y el número reducido de linfocitos en la sangre periférica. Además, los experimentos de inducción de internalización que usan células que expresan el subtipo S1P3 también demuestran que los compuestos tienen una especificidad selectiva frente a S1P1.

En particular, en comparación con los agonistas S1P1 conocidos y el compuesto que se muestra en la fórmula IA, los compuestos de la presente invención obtenidos a través de sustitución con halógeno tienen una semivida significativamente más corta. Los experimentos fármaco-cinéticos demostraron que la semivida de esos compuestos se acortó de forma significativa desde aproximadamente 11 horas a menos de 5,5 horas. Ambos modos de administración oral e intravenoso mostraron una semivida significativamente más corta, lo cual resultó coherente con el parámetro reducido de tiempo de residencia medio. Lo que es más, resulta parte de la invención la sustitución con sustituyentes específicos en posiciones específicas. Además, aunque la semivida del compuesto obtenido por medio de sustitución en la misma posición con un alquilo inferior, especialmente con metilo (Compuesto 5; no de acuerdo con la invención) no se vea acortada, los efectos sobre los linfocitos in vivo son similares a los de los compuestos sustituidos con halógeno. Estos resultados indican que los compuestos proporcionados por medio de la presente invención son una segunda generación potencial cualificada de agonistas S1P1.

En otro aspecto, para el compuesto representado por medio de la Fórmula IB (Compuesto 2), la presente invención además proporciona un método de síntesis que implica condiciones de reacción simples, y resulta conveniente para el postratamiento y apropiado para la preparación industrializada con elevado rendimiento y un proceso estable.

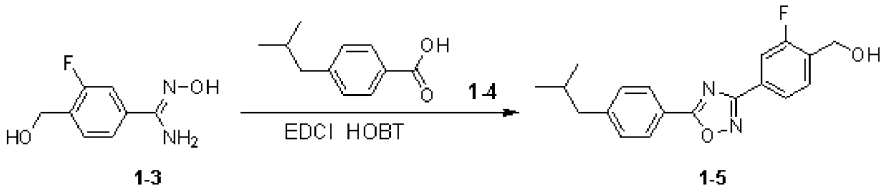
En breve, el esquema de síntesis de la presente invención es el siguiente:



Fórmula IB (Compuesto 2)

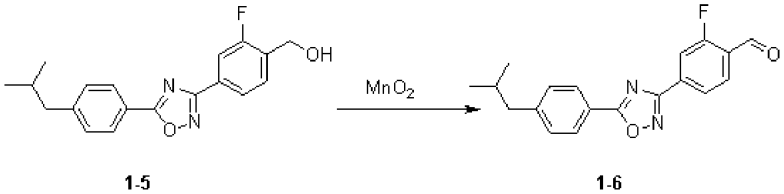
Específicamente, la presente invención proporciona un método de síntesis de un compuesto que es ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (también denominado “Compuesto 2”) que se muestra en la Fórmula IB, que comprende las siguientes etapas:

(1) hacer reaccionar 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 con ácido 4-isobutilbenzoico que se muestra en la fórmula 1-4, en presencia de agentes de condensación clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropili)-3-etilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol para generar alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5:



de acuerdo con la invención, se purifica el producto bruto obtenido tras la generación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 a través de cristalización, en el que el disolvente de cristalización utilizado es una mezcla de metanol y agua con una relación de 3:1 en volumen, y la relación de producto bruto (en g, en peso) con respecto a disolvente de cristalización (en mol, en volumen) es de 1:5;

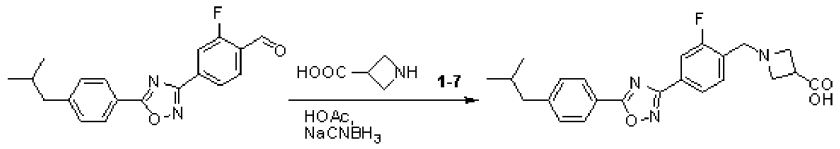
(2) hacer reaccionar el alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 obtenido en la etapa (1) con dióxido de manganeso para generar 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6:



;

de acuerdo con la invención, la reacción se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es acetato de etilo, la relación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 (en g, en peso) con respecto al disolvente de reacción (en ml, en volumen) es de 1:10, y la relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso es de 1:6;

(3) hacer reaccionar el 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 obtenido en la etapa (2) con ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 mediante el uso de ácido acético como catalizador y cianoborohidruro de sodio como agente reductor para generar el compuesto que se muestra en la fórmula IB:



1-6 **Fórmula IB (Compuesto 2)**

;

de acuerdo con la invención, la reacción se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es metanol, la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a cianoborohidruro de sodio es 1:1, y el cianoborohidruro de sodio se disuelve en metanol y se añade gota a gota sobre el sistema de reacción a una temperatura de 15-20 ºC.

En la presente memoria, se describe que la etapa (1) también comprende una etapa de purificación del producto bruto obtenido tras la generación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5; preferentemente, la purificación se lleva a cabo a través de cromatografía en columna o cristalización. De acuerdo con la invención, la purificación se lleva a cabo a través de cristalización.

Cuando se lleva a cabo la purificación a través de cristalización, el disolvente de cristalización utilizado es uno o más seleccionado entre metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etilo y agua; preferentemente, el disolvente de cristalización es una mezcla de metanol y agua; de acuerdo con la invención, el disolvente de cristalización es una mezcla de metanol y agua en una relación de 3:1 en volumen. Preferentemente, la relación de producto bruto (en g, en peso) con respecto a disolvente de cristalización (en ml, en volumen) es de 1:3-20; de acuerdo con la invención la relación de producto bruto (en g, en peso) con respecto a disolvente de cristalización (en ml, en volumen) es de 1:5.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la cristalización se lleva a cabo a 20 ºC.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, (a) la reacción de la etapa (1) se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es uno o más seleccionado entre acetonitrilo, N-metilpirrolidona y N,N-dimetilformamida; la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 80-140 ºC; y la relación molar de 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 y ácido 4-isobutil benzoico que se muestra en la fórmula 1-4 es de 1:1-2,0, y/o (b) en la etapa (1), el disolvente de reacción es N,N-dimetilformamida; preferentemente la temperatura de reacción es de 130-140 ºC; preferentemente la relación molar de 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 con respecto a ácido 4-isobutil benzoico que se muestra en la fórmula 1-4 es de 1:1-1,5, más preferentemente de 1:1-1,2.

En algunas realizaciones de la invención, en la etapa (2) la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 40-70 ºC, preferentemente de 60-70 ºC.

En algunas realizaciones de la invención, en la etapa (3) la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 es de 1:1-1,2, y la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0-30 ºC durante un período de reacción de 1-16 horas.

En algunas realizaciones de la invención, en la etapa (3) la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a ácido 3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 es 1:1-1,1, más preferentemente 1:1; preferentemente, la temperatura de reacción es de 10-20 ºC, más preferentemente de 15-20 ºC; preferentemente el período de reacción es de 4-16 horas.

También se describe en la presente memoria que la etapa de reacción (2) se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es uno o más seleccionados entre tolueno, tetrahidrofurano y acetato de etilo; la relación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 (en g, en peso) con respecto al disolvente de reacción (en ml, en volumen) es de 1:10-30; la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 40-70 ºC; y la relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso es de 1:4-10.

Preferentemente, en la etapa (2) el disolvente de reacción es acetato de etilo; la relación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 (en g, en peso) con respecto al disolvente de reacción (en ml, en volumen) es 1:10; preferentemente, la temperatura de reacción es de 60-70 ºC; y preferentemente, la relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso es de 1:5-6, más preferentemente 1:6.

Dentro del contexto de la presente invención se describe en la presente memoria que la reacción de la etapa (3) se lleva a cabo en un disolvente de reacción que está seleccionado entre tetrahidrofurano y/o metanol; la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 a ácido acetidin-3-carboxílico como se muestra en la fórmula 1-7 es 1:1-1,2; la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a cianoborohidruro de sodio es de 1:0,5-6; la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0-30 ºC durante un período de reacción de 1-16 horas.

Preferentemente, en la etapa (3), el disolvente de reacción es metanol; preferentemente, la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 es de 1:1-1,1, más preferentemente de 1:1, preferentemente, el cianoborohidruro de sodio se disuelve en metanol y se añade gota a gota al sistema de reacción a una temperatura de 0-20 ºC, más preferentemente de 15-20 ºC; preferentemente, la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a cianoborohidruro de sodio es 1:1; preferentemente, la temperatura de reacción es de 10-20 ºC, más preferentemente 15-20 ºC; y preferentemente, el período de reacción es de 4-16 horas.

En la etapa (1) del método de síntesis del compuesto representado por medio de la fórmula IB (compuesto 2) proporcionado por medio de la presente invención, la purificación del producto bruto intermedio se lleva a cabo preferentemente con cristalización, en lugar de cromatografía en columna. La operación de purificación se simplifica y se evita el uso de grandes cantidades de disolvente mediante el abandono de la cromatografía en columna que precisa de grandes cantidades de disolvente, es menos respetuosa con el medio ambiente y conlleva un elevado coste. Al mismo tiempo, los reaccionantes, disolventes y las cantidades de los mismos usadas en cada etapa del método proporcionados por medio de la presente invención también se ajustan. Por ejemplo, en la etapa (2), se puede usar una cantidad reducida de dióxido de manganeso para disminuir el coste; y se usa acetato de etilo, en lugar de tetrahidrofurano, como disolvente de reacción para evitar riesgos de seguridad que puedan surgir. En la etapa (3), se usa metanol como disolvente de reacción, lo cual puede reducir la generación de subproductos durante la reacción, aumentar el rendimiento de la reacción y reducir la cantidad de disolvente usado en la reacción. Hablando en términos generales, el coste disminuye y es posible la fabricación a gran escala y bajo coste, elevada eficiencia y elevado nivel de seguridad a través de estas mejoras.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describen las realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos con detalle, en las que,

La **Figura 1** muestra los resultados de los experimentos farmacocinéticos de los compuestos proporcionados por medio de la presente invención en el Ejemplo 6, mostrando la Figura 1A la variación con el tiempo de los datos de concentración de fármaco in vivo en ratas tras la administración oral del compuesto 2, 3 y 4, y la Figura 1B muestra los datos de la variación con el tiempo de la concentración de fármaco in vivo en ratas tras la administración oral del compuesto 1 y 5.

La **Figura 2** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 8, que muestra que el número de linfocitos en sangre periférica se redujo por medio del compuesto 2 de la presente invención.

La **Figura 3** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 8, que muestra que el número de linfocitos en sangre periférica se redujo por medio de los compuestos 3 y 4 de la presente invención, en el que los compuestos 3 y 4 se administraron a 0,1 mg/kg de peso corporal en ratas.

La **Figura 4** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 8, que muestra que el número de linfocitos en sangre periférica se redujo por medio del compuesto 5 (no de acuerdo con la invención), en el que el compuesto 5 se administró a 0,1 mg/kg de peso corporal en ratas.

La **Figura 5** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 9, que muestra que el compuesto 2 proporcionado por medio de la presente invención inhibió el desarrollo del artronco de artritis.

La **Figura 6** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 9, que muestra que el compuesto 2 proporcionado por medio de la presente invención inhibió el daño de la estructura de la articulación en artritis.

La **Figura 7** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 10, que muestra que el compuesto 2 proporcionado por medio de la presente invención inhibió el desarrollo de EAE.

La **Figura 8A a 8C** muestra los resultados experimentales del Ejemplo 11, que muestra el efecto del compuesto 2 proporcionado por medio de la presente invención sobre el índice electrocardiográfico.

Breve descripción de las realizaciones preferidas

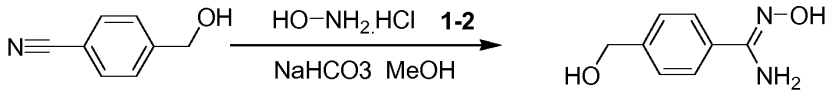
La presente invención se describe con detalle en combinación con las realizaciones siguientes. Se aprecia por parte de los expertos en la técnica que las realizaciones proporcionadas se usan únicamente para ilustrar la presente

invención, en lugar de limitar el alcance de la presente invención en modo alguno. El alcance de protección viene determinado por las reivindicaciones adjuntas.

Los métodos experimentales de las siguientes realizaciones, si no se proporciona ninguna otra instrucción especial, son todos métodos convencionales. Las materias primas, reactivos y otros materiales usados en los siguientes ejemplos, si no se proporciona ninguna otra instrucción especial, se encuentran comercialmente disponibles.

Ejemplo 1: Síntesis de ácido 1-{4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 1)

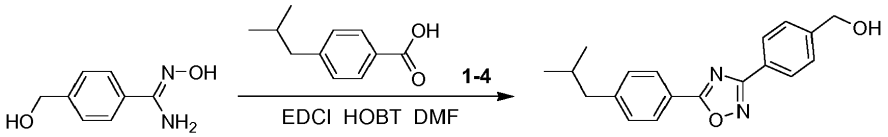
1.1 (Z)-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3)



1-1 **1-3**

Se añadieron sucesivamente clorhidrato de hidroxilamina (**1-2**, 20,903 g, 300,76 mmoles) y bicarbonato sódico (50,5 g, 601,5 mmoles) a una disolución de 4-hidroximetil benzonitrilo (**1-1**, 20 g, 150,38 mmoles) en metanol (250 ml) para obtener una suspensión que se calentó posteriormente a reflujo durante 5 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (100 ml), y se concentró el filtrado obtenido para obtener (Z)-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que fue un producto bruto blanco (1-3, 24,8 g del producto bruto, 99,3 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 167,3 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CD3OD) *δ*: 7,64 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,40 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,65 (s, 2H).

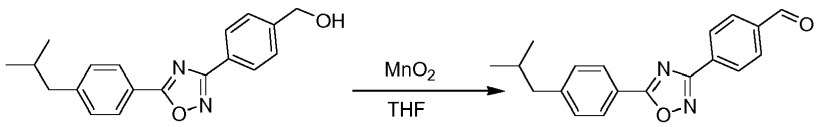
Alcohol 1,2 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5)



1-3 **1-5**

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de ácido 4-isobutil benzoico (**1-4**, 26,6 g, 149,4 mmoles), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI, 28,685 g, 149,4 mmoles) e 1-hidroxibenzonitrilo (20,169 g, 149,4 mmoles) en N,N-dimetilformamida (200 ml) durante 30 minutos antes de la adición de (Z)-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 24,8 g, 149,4 mmoles). Se calentó el sistema mixto obtenido en un baño de aceite a 140 ºC durante 2 horas. LC-MS indicó que la reacción fue completa. Posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró la mayoría de N,N-dimetilformamida por medio de destilación a presión reducida. Se extrajo el sistema de reacción con agua y acetato de etilo, y se lavó sucesivamente la fase orgánica obtenida con una disolución de HCl 0,5 N, disolución de $NaHCO_3$ saturada y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente se concentró el filtrado a sequedad. A continuación, se purificó el residuo por medio de cromatografía en columna (sistema de elución; éter de petróleo:acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener alcohol 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]bencílico que fue un producto sólido blanco (**1-5**, 34,5 g, 75 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS MS (ESI): *m/z* 309,0 [M+H]+. RMN: RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) *δ*: 8,16 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,12 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,51 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,79 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,57 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,85 (t, 1H), 0,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H).

1,3 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6)

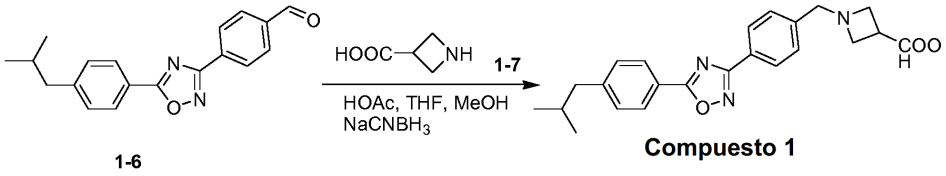


1-5 **1-6**

A 60 ºC, se agitó un sistema de suspensión de alcohol 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5, 17,7 g, 57,5 mmoles) y dióxido de manganeso (50 g, 575 mmoles) en tetrahidrofurano (330 ml) durante 2 horas. A continuación, se enfrió el sistema de suspensión a temperatura ambiente, se filtró y se concentró a sequedad. Se purificó posteriormente el residuo por medio de cromatografía en columna (sistema de elución; éter de petróleo:acetato de etilo = 20/1) para obtener 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco

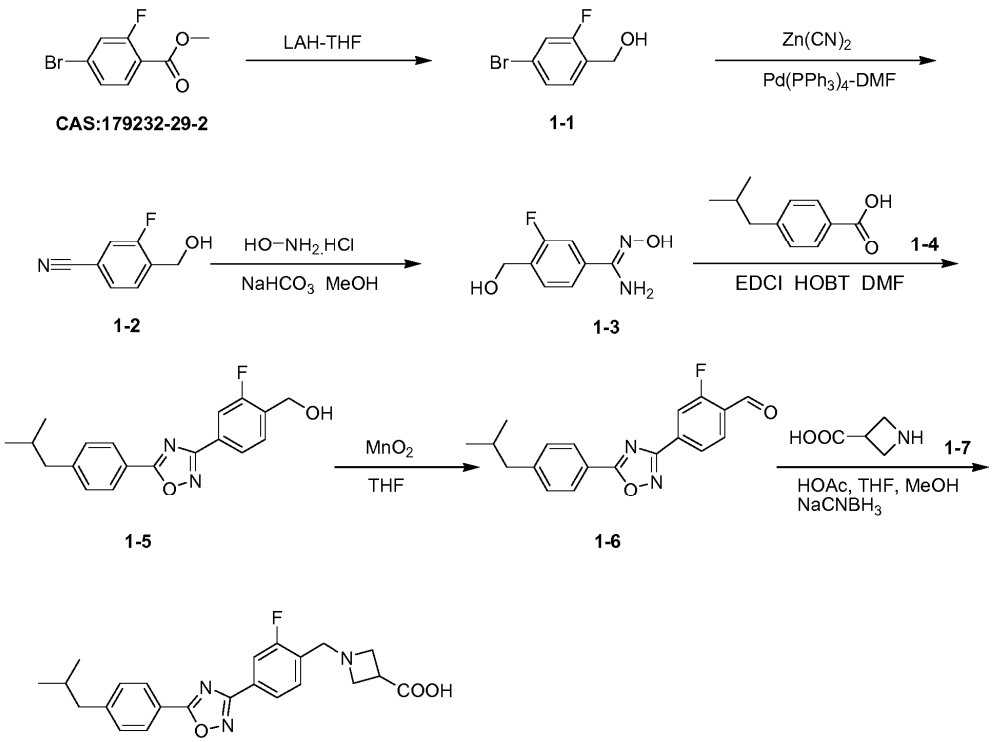
(1-6, 16,44 g, 93,5 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 307,2 $[M+H]^+$.

2. Ácido 1-{4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico

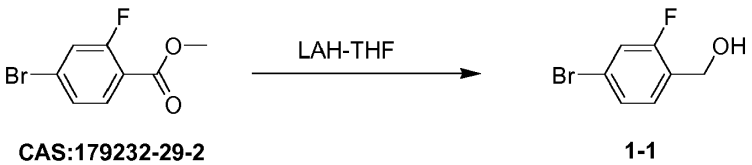


A temperatura ambiente, se agitó una disolución de 4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 10 g, 32,7 mmoles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 3,63 g, 36 mmoles) y ácido acético (15 ml) en metanol-tetrahidrofurano (200 ml/200 ml) durante 2 horas. A continuación, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio (1,03 g, 16,35 mmoles) en metanol (60 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (90 ml) y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (5,5 g; se recogió producto de reducción **1-5** a partir del compuesto **1-6**, y posteriormente se oxidó y se sometió a aminación reductiva para obtener 5 g de producto final; rendimiento 82 %). El pico de ion molecular por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 392,2 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CD3OD) δ: 8,23 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,15 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,64 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,12 (m, 4H), 3,42 (m, 1H), 2,63 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,97 (m, 1H), 0,97 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 2: Síntesis de ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 2)



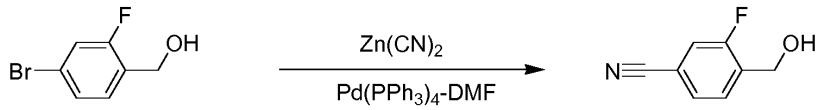
1.1. Alcohol 4-bromo-2-fluorobencílico (1-1)



A 0 ºC, se añadió gota a gota hidruro de aluminio y litio (1,14 g, 30 mmoles) a una disolución de 4-bromo-2-fluorobenzoato de metilo (4,66 g, 20 mmoles) en tetrahidrofurano (100 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-

sal usado tras la adición gota a gota. La reacción fue completa (detectado por medio de LCMS y TLC) tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enfrió la mezcla a 0 ºC de nuevo y se inactivó la reacción con agua (1,14 ml) y una disolución de NaOH al 10 % (11,4 ml), respectivamente. Tras agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró la mezcla y posteriormente se lavó la torta filtrante con tetrahidrofurano (50 mlx2) y acetato de etilo EA (50 mlx2). Se secó el filtrado con sulfato de sodio anhidro, se filtró y posteriormente se concentró para obtener un producto oleoso incoloro (3,4 g, rendimiento de 83 %).

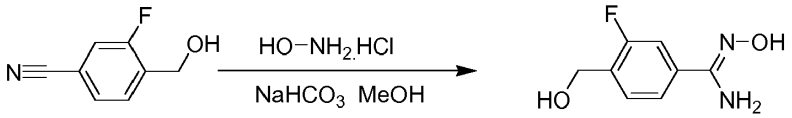
1.2 3-fluoro-4-hidroximetil benzonitrilo (1-2)



1-1 **1-2**

Se añadieron cianuro de cinc (1,85 g, 15,85 mmoles) y tetraquis (trifenilfosfino) paladio ($Pd(PPh_3)_4$, 0,916 g, 0,79 mmoles) a una disolución de alcohol 4-bromo-2-fluorobencílico (1-1, 3,25 g, 15,85 mmoles) en DMF (35 ml). Tras someter a desoxigenación por medio de burbujeo de argón, se calentó la mezcla de reacción a 100 ºC y se hizo reaccionar durante 16 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (100 ml), se lavó sucesivamente con agua (100 mlx3) y salmuera saturada (100 mlx3), se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado para obtener el producto bruto. A continuación, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 15/1-4/1) para obtener un producto sólido blanco (0,72 g, 30 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 152,1 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 7,63 (t, J = 7,6 Hz, 8,0 Hz, 1H), 7,48 (dd, J = 1,2 Hz, 8,0 Hz, 1H), 7,48 (dd, J = 1,2 Hz, 9,2 Hz, 1H), 4,83 (d, J = 10 Hz, 2H), 2,00 (t, J = 10 Hz, 1H).

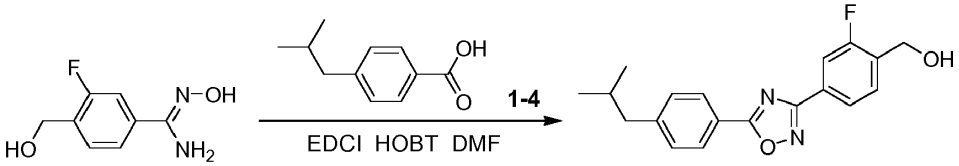
1,3 (Z)-3-fluoro-N'-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3)



1-2 **1-3**

Se añadieron sucesivamente clorhidrato de hidroxilamina (0,645 g, 9,28 mmoles) y bicarbonato sódico (1,56 g, 18,56 mmoles) a una disolución de 3-fluoro-4-hidroximetil benzonitrilo (**1-2**, 0,70 g, 4,64 mmoles) en metanol (150 ml) para obtener una suspensión que posteriormente se trató a reflujo durante 5 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml) y se concentró el filtrado obtenido para obtener 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que fue un producto bruto (**1-3**, 0,846 g, 99 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 185,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CD3OD) δ: 7,51~7,45 (m, 2H), 7,37~7,34 (m, 1H), 4,67 (s, 2H).

1,4 Alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5)

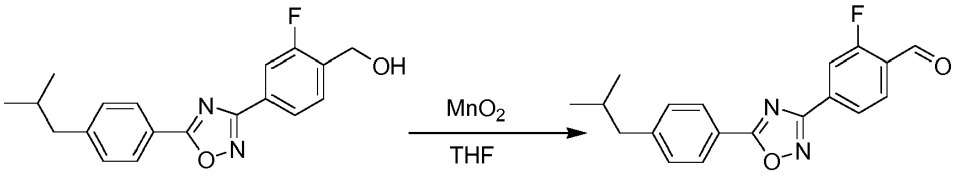


1-3 **1-5**

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de ácido 4-isobutil benzoico (**1-4**, 0,819 g, 4,60 mmoles), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI, 0,882 g, 4,60 mmoles) e 1-hidroxibenzotriazol (0,621 g, 4,60 mmoles) en N,N-dimetilformamida (10 ml) durante 30 minutos antes de la adición de (Z)-3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,846 g, 4,60 mmoles). Se calentó el sistema mixto en un baño de aceite a 140 ºC durante 2 horas. LCMS indicó que los materiales de partida reaccionaron de forma completa. Se enfrió posteriormente a temperatura ambiente y se retiró la mayoría de N,N-dimetilformamida por medio de destilación a presión reducida. Se extrajo la mezcla con agua y acetato de etilo, y se lavó sucesivamente la fase orgánica obtenida con una disolución de HCl 0,5 N, disolución de NaHCO3 saturada y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente se concentró el filtrado a sequedad. A continuación, se purificó el residuo por medio de cromatografía en columna

(sistema de elución: éter de petróleo: acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido blanco (**1-5**, 0,92 g, 61 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 327,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) *δ*: 8,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, *J* = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H).

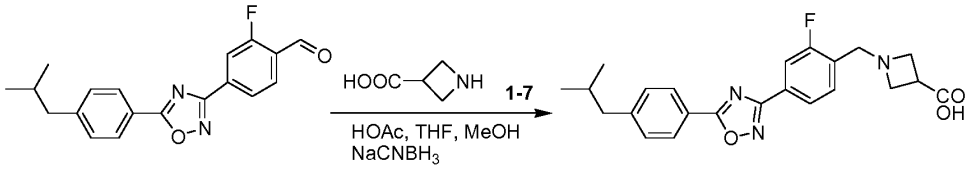
1,5 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6)



1-5 **1-6**

A 60 ºC, se agitó un sistema de suspensión de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,91 g, 2,79 mmoles) y dióxido de manganeso (2,43 g, 27,9 mmoles) en tetrahidrofurano (30 ml) durante 2 horas. Posteriormente se enfrió el sistema de suspensión a temperatura ambiente, se filtró y se concentró para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 0,90 g, 99,6 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 325,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) *δ*: 10,42 (s, 1H), 8,12~7,99 (m, 5H), 7,34 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, *J* = 6,4 Hz, 6H).

1,6 Ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 2)

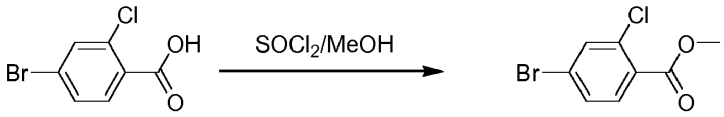


1-6 **Compuesto 2**

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6, 0,90 g, 2,78 mmoles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 0,28 g, 2,78 mmoles) y ácido acético (1 ml) en metanol-tetrahidrofurano (20 ml/20 ml) durante 2 horas. A continuación, se añadió una disolución de cianoborohidruro sódico (1,03 g, 16,35 mmoles) en metanol (60 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml) y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (**Compuesto 2**) que fue un producto sólido blanco (0,20 g, 18 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 410,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CD3OD) *δ*: 8,13 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, *J* = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 3: Síntesis de ácido 1-{2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 3)

1,1 4-bromo-2-clorobenzoato de metilo (185312-82-7)

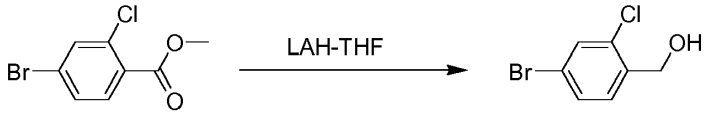


CAS:59748-90-2 **CAS:185312-82-7**

A 0 ºC, se añadió gota a gota cloruro de tionilo (3,57 g, 30 mmoles) a una disolución de ácido 4-bromo-2-clorobenzoico (4,71 g, 20 mmoles) en metanol (100 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-sal usado después del goteo y a continuación se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 horas. TLC y LCMS indicaron que los materiales de partida reaccionaron de forma completa. El disolvente y el cloruro de tionilo en exceso se retiraron por medio de evaporación rotatoria para proporcionar el producto bruto. A continuación, se disolvió el producto bruto en diclorometano (100 ml), se lavó sucesivamente con disolución de bicarbonato sódico saturado (100 mlx2) y salmuera saturada (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se obtuvo un producto sólido amarillo (4,79 g,

96 % de rendimiento) por medio de evaporación rotatoria. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 248,9,8/250,8/252,8 [M+H]+.

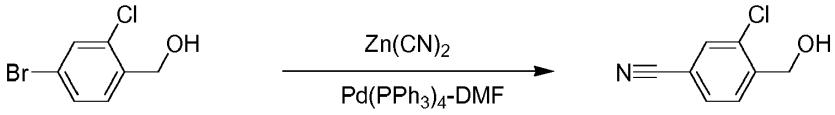
1,2 Alcohol 4-bromo-2-clorobencílico (1-1)



CAS:185312-82-7 **1-1**

A 0 ºC, se añadió gota a gota hidruro de aluminio y litio (1,09 g, 30 mmoles) a una disolución de 4-bromo-2-clorobenzoato de metilo (4,78 g, 19,16 mmoles) en tetrahidrofurano (100 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-sal usado después de ese goteo. La reacción fue completa (detectada con LCMS y TLC) tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enfrió la mezcla a 0 ºC de nuevo y se inactivó la reacción con agua (1,09 ml) y una disolución de NaOH al 10 % (10,9 ml) respectivamente. Tras agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró la mezcla y posteriormente se lavó la torta filtrante con tetrahidrofurano (50 mlx2) y acetato de etilo EA (50 mlx2). Se secó el filtrado con sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se concentró posteriormente para obtener un producto oleoso incoloro (3,4 g, 80 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 202,9/204,9 $[M-OH]^+$.

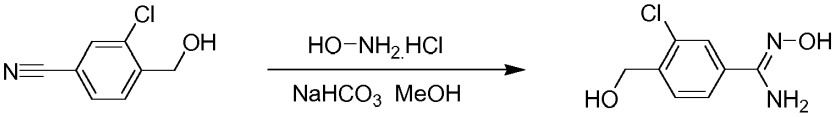
1,3 3-cloro-4-hidroximetil benzonitrilo (1-2)



1-1 **1-2**

Se añadieron cianuro de cinc (0,67 g, 5,73 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfino) paladio ($Pd(PPh_3)_4$, 0,33 g, 0,287 mmoles) a una disolución de alcohol 4-bromo-2-clorobencílico (**1-1**, 1,27 g, 5,73 mmoles) en DMF (15 ml). Tras desoxigenar por medio de burbujeo de argón, se calentó la mezcla de reacción a 100 ºC y se hizo reaccionar durante 16 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con agua (50 mlx3) y salmuera saturada (50 mlx3), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado para obtener un producto bruto. Posteriormente, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 15/1-4/1) para obtener un producto sólido blanco (0,387 g, 40 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 168,0/170,1 $[M+H]^+$.

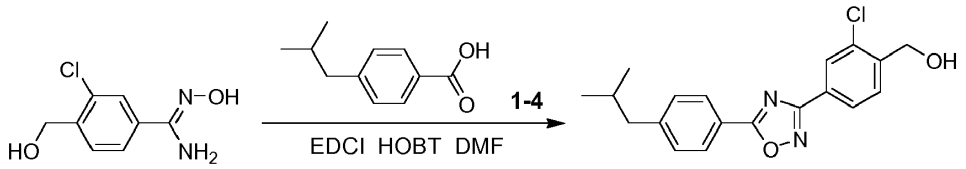
1,4 (Z)-3-cloro-N'-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3)



1-2 **1-3**

Se añadieron sucesivamente clorhidrato de hidroxilamina (0,321 g, 4,62 mmoles) y bicarbonato sódico (0,776 g, 9,24 mmoles) a una disolución de 3-cloro-4-hidroximetil-benzonitrilo (**1-2**, 0,387 g, 2,31 mmoles) en metanol (80 ml) para obtener una suspensión que posteriormente se calentó a reflujo durante 5 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml) y se concentró el filtrado obtenido para obtener, en forma de producto bruto blanco, 3-cloro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3, 0,324 g, 70 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 201 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, DMSO-*d6*) *δ*: 9,74 (a, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,67 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,88 (a, 2H), 5,49 (a, 1H), 4,27 (s, 2H).

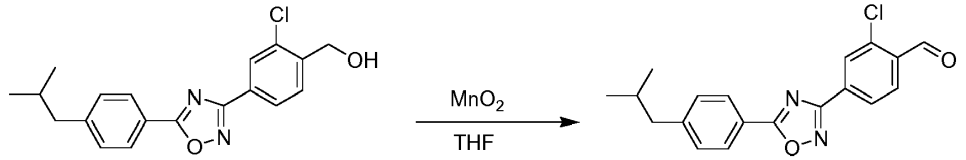
1,5 Alcohol 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5)



1-3 1-5

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de ácido 4-isobutil benzoico (**1-4**, 0,288 g, 1,62 mmoles), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI, 0,31 g, 1,62 mmoles) e 1-hidroxibenzotriazol (0,219 g, 1,62 mmoles) en N,N-dimetilformamida (8 ml) durante 30 minutos antes de la adición de (Z)-3-cloro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,324 g, 1,21 mmoles). Se calentó el sistema mixto obtenido en un baño de aceite de 140 ºC durante 2 horas. LCMS indicó que los materiales de partida reaccionaron de forma completa. Se enfrió a temperatura ambiente y se retiró la mayoría de N,N-dimetilformamida por medio de destilación a presión reducida. Se extrajo la mezcla con agua y acetato de etilo, y se lavó sucesivamente la fase orgánica obtenida con una disolución de HCl 0,5 N, disolución de NaHCO3 saturada y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente se concentró el filtrado a sequedad. Posteriormente, el residuo se purificó por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener alcohol 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido blanco (**1-5**, 0,36 g, 65 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 343,0/345,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) *δ*: 8,16 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,07 (dd, *J* = 1,2 Hz, 8,0 Hz, 1H), 7,66 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 0,94 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H).

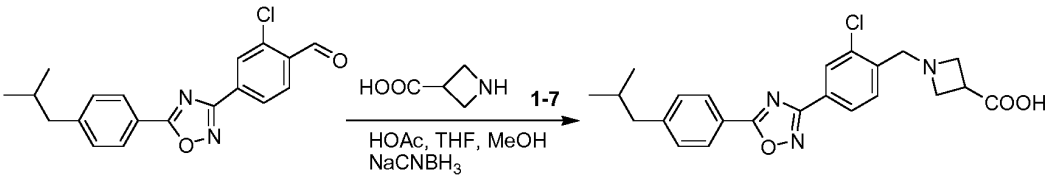
1,6 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6)



1-5 1-6

A 40 ºC, se agitó alcohol 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,36 g, 1,05 mmoles) y dióxido de manganeso (0,914 g, 10,5 mmoles) en tetrahidrofurano (30 ml) durante 2 horas. A continuación, se enfrió el sistema de suspensión a temperatura ambiente, se filtró y se condensó para obtener un producto bruto. El producto bruto se purificó por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 20/1-10/1) para obtener 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 0,34 g, 95 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 341,1 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) *δ*: 10,52 (s, 1H), 8,28 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 8,16 (dd, *J* = 1,2 Hz, 8,4 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,04 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 2,58 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 0,94 (d, *J* = 7,6 Hz, 6H).

1.7 Ácido 1-{2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 3)



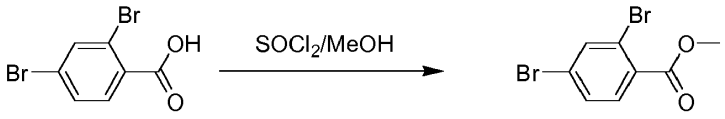
1-6 **Compuesto 3**

Se agitó 2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 0,34 g, 1,0 mmoles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 0,101 g, 1,0 mmoles) y ácido acético (0,35 ml) en metanol-tetrahidrofurano (10 ml/10 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio (0,378 g, 6,0 mmoles) en metanol (20 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml) y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-cloro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (**Compuesto 3**) que fue un producto sólido blanco (0,109 g, 26 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS(ESI) *m/z* 426,1/428,3 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CD3OD) *δ*: 8,33

(d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 8,22 (dd, *J* = 1,6 Hz, 8,0 Hz, 1H), 8,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,72 (s, 2H), 4,46 (m, 4H), 3,74 (m, 1H), 2,63 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,97 (m, 1H), 0,96 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 4: Síntesis de ácido 1-{2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 4)

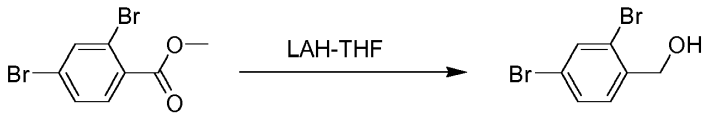
1.1 2,4-Dibromobenzoato de metilo (54335-33-0)



CAS:611-00-7 **CAS:54335-33-0**

A 0 ºC, se añadió gota a gota cloruro de tionilo (3,57 g, 30 mmoles) a una disolución de ácido 2,4-dibromobenzoico (5,60 g, 20 mmoles) en metanol (100 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-sal usado tras ese goteo y posteriormente se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 horas. TLC y LCMS indicaron que los materiales de partida reaccionaron de forma completa. Se retiraron el disolvente y el cloruro de tionilo en exceso por medio de evaporación rotatoria para proporcionar un producto bruto. A continuación, el producto bruto se disolvió en diclorometano (100 ml), se lavó sucesivamente con disolución de bicarbonato sódico saturada (100 mlx2) y salmuera saturada (100 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se obtuvo un producto sólido amarillo (5,92 g, 100 % de rendimiento) por medio de evaporación rotatoria. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 292,8/294,7/269,9 $[M+H]^+$.

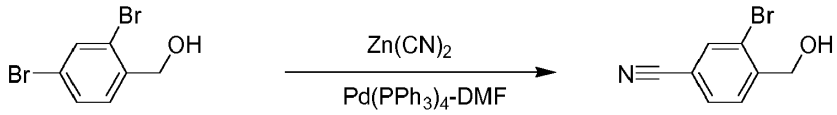
1.2 Alcohol 2,4-dibromobencílico (1-1)



CAS:54335-33-0 **1-1**

A 0 ºC, se añadió gota a gota hidruro de aluminio y litio (1,14 g, 30 mmoles) a una disolución de 2,4-dibromobenzoato de metilo (5,90 g, 20 mmoles) en tetrahidrofurano (120 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-sal usado tras ese goteo. La reacción fue completa (detectado con LCMS y TLC) tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enfrió la mezcla a 0 ºC de nuevo y se inactivó la reacción con agua (1,14 ml) y una disolución de NaOH al 10 % (11,4 ml), respectivamente. Tras agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró la mezcla y posteriormente se lavó la torta filtrante con tetrahidrofurano (60 mlx2) y acetato de etilo EA (60 mlx2). Se secó el filtrado con sulfato de sodio anhidro, se filtró, concentró y posteriormente se purificó por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener un producto oleoso incoloro (2,3 g, 43 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 246,9/248,9/250,9 $[M-OH]^+$.

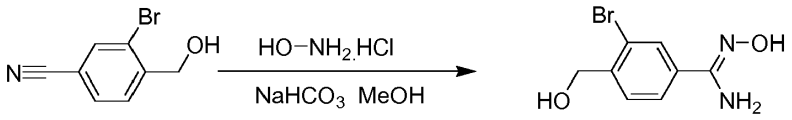
1,3 3-bromo-4-hidroximetil benzonitrilo (1-2)



1-1 **1-2**

Se añadieron cianuro de cinc (1,01 g, 8,65 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfino) paladio ($Pd(PPh_3)_4$, 0,50 g, 0,43 mmoles) a una disolución de alcohol 2,4-dibromobencílico (**1-1**, 2,3 g, 8,65 mmoles) en DMF (20 ml). Tras someter a desoxigenación por medio de burbujeo de argón, se calentó la mezcla de reacción a 80 ºC y se hizo reaccionar durante 5 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (80 ml), se lavó sucesivamente con agua (80 mlx3) y salmuera saturada (80 mlx3), se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado para obtener un producto bruto. Posteriormente, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 15/1-4/1) para obtener un producto sólido blanco (0,81 g, 44 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 211,9/213,9 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 7,82 (s, 1H), 7,69 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 4,80 (s, 2H).

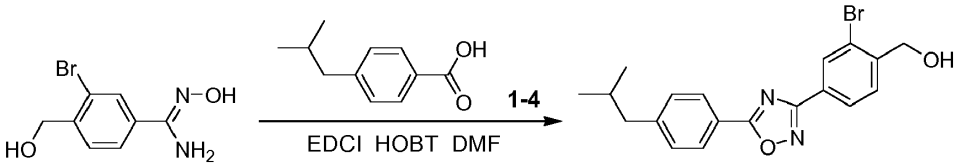
1,4 (Z)-3-bromo-N'-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3)



1-2 **1-3**

Se añadieron sucesivamente clorhidrato de hidroxilamina (0,524 g, 7,54 mmoles) y bicarbonato sódico (1,27 g, 15,08 mmoles) a una disolución de 3-bromo-4-hidroximetil-benzonitrilo (**1-2**, 0,80 g, 3,77 mmoles) en etanol (120 ml) para obtener una suspensión que posteriormente se calentó a reflujo durante 5 horas. Posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml), y se concentró el filtrado para obtener 3-bromo-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que fue un producto bruto blanco (**1-3**, 0,90 g, 97 % de rendimiento) que se usó directamente en la siguiente etapa. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 245/247 $[M+H]^+$.

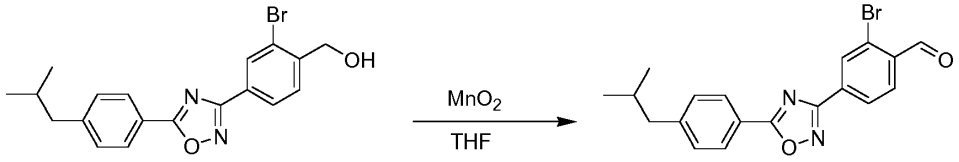
1,5 Alcohol 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5)



1-3 **1-5**

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de ácido 4-isobutil benzoico (**1-4**, 0,653 g, 3,67 mmoles), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI, 0,704 g, 3,67 mmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (0,495 g, 3,77 mmoles) en N,N-dimetilformamida (10 ml) durante 30 minutos antes de la adición de (Z)-3-bromo-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,90 g, 3,67 mmoles). Se calentó el sistema mixto en un baño de aceite de 140 ºC durante 2 horas. LCMS indicó que los materiales reaccionaron de forma completa. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró la mayoría de N,N-dimetilformamida por medio de destilación a presión reducida. Se extrajo la mezcla con agua y acetato de etilo, y se lavó sucesivamente la fase obtenida con una disolución de HCl 0,5 N, disolución de NaHCO3 saturada y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente se concentró el filtrado a sequedad. A continuación, se purificó el residuo por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo: acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener alcohol 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido blanco (**1-5**, 0,36 g, 36 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: (ESI): *m/z* 387,1/389,1 [M+H]+.

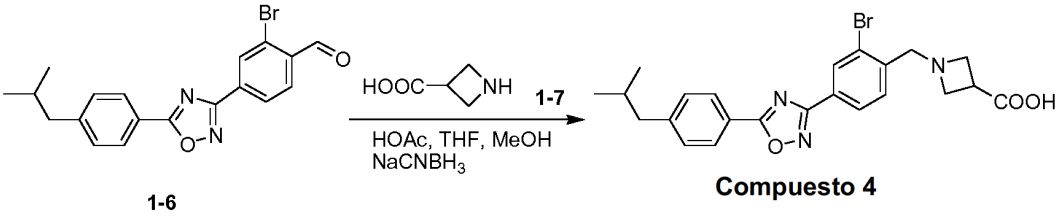
1,6 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6)



1-5 **1-6**

A 50 ºC, se agitó una suspensión de alcohol 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,51 g, 1,32 mmoles) y dióxido de manganeso (1,15 g, 13,2 mmoles) en tetrahidrofurano (30 ml) durante 2 horas. Posteriormente, se enfrió el sistema de suspensión a temperatura ambiente, se filtró y se concentró para obtener un producto bruto. Se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 20/1-10/1) para obtener 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 0,34 g, 67 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 385,0/387,0 $[M+H]^+$.

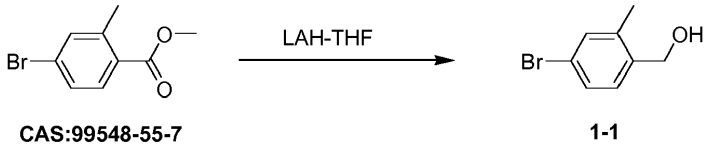
1,7 Ácido 1-{2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 4)



A temperatura ambiente, se agitó una disolución de 2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6, 0,34 g, 0,88 mmoles), ácido acetidin-3-carboxílico (1-7, 0,089 g, 0,88 mmoles) y ácido acético (0,3 ml) en metanol-tetrahidrofurano (10 ml/10 ml) durante 2 horas. Posteriormente, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio (0,333 g, 5,28 mmoles) en metanol (20 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 ml) y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-bromo-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazl-3-il]-bencil{-3-acetidin carboxílico (**Compuesto 4**) que fue un producto de sólido blanco (0,1112 g, 27 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 469,9/471,8 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,39 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 8,12 (dd, J = 1,2 Hz, 8,4 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,70 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,23 (s, 2H), 4,08 (m, 2H), 3,99 (m, 2H), 3,44 (m, 1H), 2,56 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,91 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

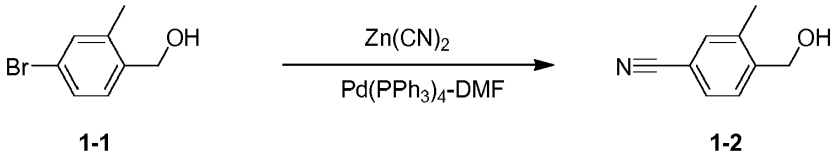
Ejemplo 5 (no de acuerdo con la invención): Síntesis de ácido 1-{2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 5)

1,1 Alcohol 4-bromo-2-metilbencílico (1-1)



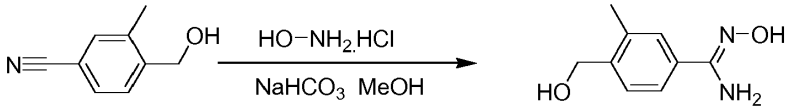
A 0 ºC, se añadió gota a gota hidruro de aluminio y litio (1,425 g, 37,5 mmoles) a una disolución de 4-bromo-2-metilbenzoato de metilo (5,725 g, 25 mmoles) en tetrahidrofurano (120 ml) de forma lenta. Se retiró el baño de hielo-sal usado tras el goteo. La reacción fue completa (detectado por medio de LCMS y TLC) tras agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se enfrió la mezcla a 0 ºC de nuevo y se inactivó la reacción con agua (1,43 ml) y una disolución de NaOH al 10 % (14,3 ml) respectivamente. Tras agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se filtró la mezcla y posteriormente se lavó la torta filtrante con tetrahidrofurano (80 mlx2) y acetato de etilo EA (80 mlx2). Se secó el filtrado con sulfato de sodio anhidro, se filtró y posteriormente se concentró para obtener un producto oleoso incoloro (4,535 g, 90 % de rendimiento).

1.2 3-metil-4-hidroximetil benzonitrilo (1-2)



Se añadieron cianuro de cinc (2,63 g, 22,5 mmoles) y tetraquis(trifenilfosfino) paladio ($Pd(PPh_3)_4$, 1,31 g, 1,13 mmoles) a una disolución de alcohol 4-bromo-2-metilbencílico (**1-1**, 4,53 g, 22,5 mmoles) en DMF (50 ml). Tras someter a desoxigenación por medio de burbujeo de argón, se calentó la mezcla de reacción a 100 ºC y se hizo reaccionar durante 16 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (120 ml), se lavó sucesivamente con agua (120 mlx3) y salmuera saturada (120 mlx3), se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Se concentró el filtrado para obtener el producto bruto. A continuación, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 15/1-4/1) para obtener un producto sólido blanco (2,8 g, 84 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 148,1 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 7,57 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,52 (d, 7,6 Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 4,76 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 2,34 (s, 3H).

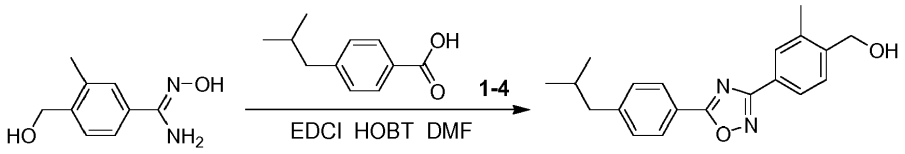
1,3 (Z)-3-metil-N'-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (1-3)



1-2 **1-3**

Se añadieron clorhidrato de hidroxilamina (2,64 g, 38 mmoles) y bicarbonato sódico (6,38 g, 76 mmoles) sucesivamente a una disolución de 3-metil-4-hidroximetil benzonitrilo (1-2, 2,8 g, 19 mmoles) en metanol (500 ml) para obtener una suspensión que se trató posteriormente a reflujo durante 5 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (100 mlx2), y se concentró el filtrado obtenido para obtener 3-metil-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que fue un producto bruto blanco (1-3, 3,425 g de producto bruto, 100 % de rendimiento), que se usó directamente en la siguiente etapa. El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 181,0 $[M+H]^+$.

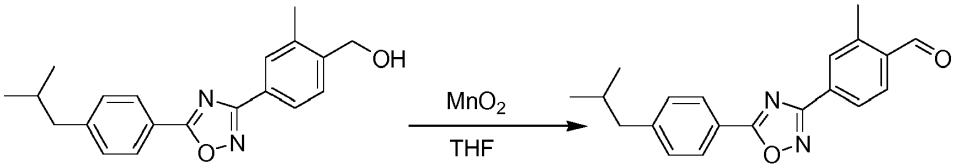
1,4 Alcohol 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (1-5)



1-3 **1-5**

A temperatura ambiente, se agitó una disolución de ácido 4-isobutil benzoico (**1-4**, 3,382 g, 19 mmoles), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI, 3,642 g, 19 mmoles) e 1-hidroxibenzotriazol (2,565 g, 19 mmoles) en N,N-dimetilformamida (60 ml) durante 30 minutos antes de la adición de (Z)-3-metil-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 3,42 g, 19 mmoles). Se calentó el sistema mixto en un baño de aceite de 140 ºC durante 2 horas. LCMS indicó que los materiales de partida reaccionaron por completo. Posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró la mayoría de N,N-dimetilformamida por medio de destilación a presión reducida. Se extrajo la mezcla con agua y acetato de etilo, y se lavó sucesivamente la fase orgánica obtenida con una disolución de HCl 0,5 N, disolución de NaHCO3 saturado y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente se concentró el filtrado a sequedad. A continuación, se purificó el residuo por medio de cromatografía en columna (sistema de elución: éter de petróleo:acetato de etilo = 10/1-4/1) para obtener alcohol 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido blanco (1-5, 2,51 g, 41 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 323,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,12 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,98 (m, 2H), 7,59 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,77 (s, 2H), 2,57 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,42 (s, 3H), 1,93 (m, 1H), 0,92 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

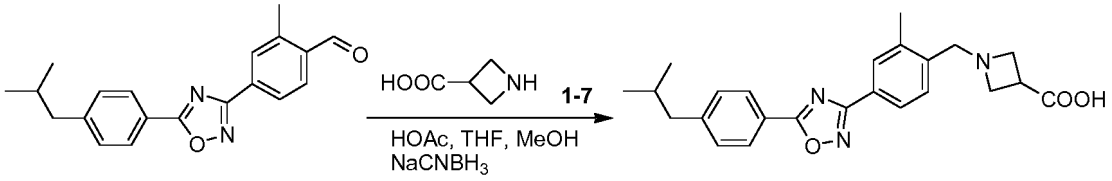
1,5 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (1-6)



1-5 **1-6**

A 60 ºC, se agitó alcohol 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 2,5 g, 7,76 mmoles) y dióxido de manganeso (6,75 g, 77,6 mmoles) en tetrahidrofurano (100 ml) durante 2 horas. A continuación, se enfrió el sistema de suspensión a temperatura ambiente, se filtró y se concentró para obtener 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 2,4 g, 97 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 321,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,38 (s, 1H), 8,20-8,13 (m, 4H), 7,97 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 2,80 (s, 3H), 2,61 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 1,96 (m, 1H), 0,96 (d, J = 7,6 Hz, 6H).

1,6 ácido 1-{2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 5)



A temperatura ambiente, se agitó 2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 0,88 g, 2,75 mmoles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 0,278 g, 2,75 mmoles) y ácido acético (1 ml) en metanol-tetrahidrofurano (20 ml/20 ml) durante 2 horas. A continuación, se añadió una disolución de cianoborohidruro de sodio (1,04 g, 16,5 mmoles) en metanol (60 ml) a la mezcla de reacción y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 16 horas adicionales y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol (10 mlx2) y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-metil-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (0,23 g, 21 % de rendimiento). El pico de ion molecular mostrado por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas fue: MS (ESI): *m/z* 406,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CD3OD) δ: 8,12 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,08 (s, 1H), 8,04 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,47 (s, 2H), 4,23 (m, 4H), 3,44 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,52 (s, 3H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 6: Experimento farmacocinético in vivo de compuestos proporcionados por medio de la presente invención

En el presente Ejemplo, se evaluaron las propiedades farmacocinéticas de los compuestos 1 (no de acuerdo con la invención), 2 (de acuerdo con la invención), 3 (de acuerdo con la invención), 4 (de acuerdo con la invención) y 5 (no de acuerdo con la invención), por medio de dosificación i.v. y p.o. a ratas de Spraque Dawley. Los animales experimentales usados en el presente ejemplo y posteriormente fueron ratas SD macho de 7-9 semanas de edad, con un peso corporal que varió de 186 a 231 g, que se adquirieron en Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. Se colocaron los animales en cuarentena por parte del veterinario durante 5 días tras la adquisición, a continuación, los animales pasaron inspección de cuarentena y se seleccionaron para el ensayo en condiciones SPE, en las que los animales sometidos a ensayo se asignaron a 3 ratas por grupo como se muestra a continuación.

Grupo de administración oral: se prepararon respectivamente 2,74 mg de cada uno de los compuestos 1-5 en una disolución de 0,3 mg/ml mediante el uso de 9,113 ml de CMC-Na al 0,5 % como diluyente. Se sometió cada disolución a agitación vorticial 1-2 minutos tras mezclar por completo, y a continuación se trató por medio de ultrasonidos durante 20-30 minutos hasta obtener una suspensión uniforme. Se usó la suspensión uniforme como medicina administrada a un grupo de administración oral, y se llevó a cabo la administración con una dosis de 10 ml/kg de peso corporal de cada rata.

Grupo de administración intravenosa: se prepararon 1,61 mg de cada uno de los compuestos 1-5 respectivamente en una disolución de 1 mg/ml mediante el uso de 1,610 ml de HP-β-CD al 10 % como diluyente. Se sometió cada disolución a agitación vorticial 1-2 minutos después de mezclar por completo, y posteriormente se sometió a tratamiento de ultrasonidos durante 28-30 minutos. Se usó la disolución obtenida como medicina administrada al grupo de administración intravenosa, y se llevó a cabo la administración con una dosis de 1 ml/kg de peso corporal de cada rata.

Tanto para el grupo de administración oral como para el grupo de administración intravenosa, se tomaron muestras de sangre a las 0,0833 h (5 minutos), 0,25 h (15 minutos), 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h después de la administración. Tras anestesia con isoflurano se tomaron 0,3 ml de sangre a partir del plexo venoso de los animales en cada momento de tiempo. Se sacrificaron los animales después de tomar todas las muestras.

Se colocaron las muestras recogidas en tubos EP que contenían heparina de sodio (aproximadamente 10 µl, 1000 IU/ml), que posteriormente se colocaron en fragmentos de hielo de forma inmediata, y se centrifugó a 4.500 rpm y baja temperatura (4 ºC) durante 5 minutos. Se aisló el plasma de forma rápida y posteriormente se almacenó a -20 ºC hasta el análisis.

Se midió la concentración de cada compuesto en sangre por medio de LC-MS/MS-001 (Q-trap-3200) con osalmida como material de patrón interno, como se muestra a continuación. Se añadieron 24 µl de plasma de blanco a la muestra de plasma de 6 µl (5 veces de dilución) y posteriormente se añadió una disolución de acetonitrilo que contenía 150 µl de material de patrón interno (osalmida en 100 µg/ml). Se agitó la mezcla durante 5 minutos, y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se implantaron 2 µl de la muestra obtenida en LC-/MS/MS para el análisis. Como para el caso de la muestra de plasma no diluida, se añadieron 30 µl de la misma a una disolución de acetonitrilo que contenía 150 µl de material de patrón interno (osalmida en 100 µg/ml). Se agitó la mezcla durante 5 minutos, y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se implantaron 2 µl de la muestra obtenida en LC-MS/MS para el análisis.

Como para el análisis de datos, se usó WinNolin (V6.2) modelo sin compartimientos (NCA) para el cálculo de los principales parámetros farmacocinéticos metabólicos incluyendo t1/2, AUC (0-t), AUCinf, V, Cl, MRT, etc., y se usó Microsoft Office EXCEL para el cálculo de los valores medios, desviaciones típicas y coeficientes de variación.

A partir de los datos mostrados en la Tabla 1, se indica claramente que, en comparación con la semivida terminal del compuesto 1 que fue de aproximadamente 11 horas, la semivida terminal de cada uno de los compuestos 2, 3 y 4 fue menor de 5,5 horas tras administración oral. Por tanto, las semividas de los tres compuestos con sustituyentes de halógeno (compuestos 2, 3 y 4) fueron casi un 50 % más cortas que las del compuesto 1.

Existe un cambio de semivida similar en el estudio de parámetros farmacocinéticos de administración intravenosa. A partir de los datos mostrados en la Tabla 2 se indica claramente que, en comparación con la semivida terminal y el tiempo de residencia medio (MRT) del compuesto 1, la semivida terminal y el tiempo de residencia medio de cada uno de los compuestos 2, 3 y 4 sustituidos con halógeno se redujeron de forma significativa. Estos datos muestran que las sustituciones de halógeno en la posición 2 el compuesto 1 pueden acelerar la eliminación de los compuestos de la sangre. Lo que es más, los resultados del estudio sobre eliminación (Cl) mostraron que, el acortamiento de la semivida terminal y el tiempo de residencia medio no vinieron provocados por la mayor eliminación de los compuestos.

No cabe esperar un acortamiento significativo en las semividas de los compuestos 2, 3 y 4 (todos de acuerdo con la invención) con la teoría convencional, ya que no se obtienen resultados similares mediante sustitución con otros sustituyentes en la misma posición del compuesto 1 (no de acuerdo con la invención). Por ejemplo, la semivida se amplió en lugar de acortarse (véase Tabla 1 y 2) cuando el sustituyente es metilo (lo que corresponde al compuesto 5; no de acuerdo con la invención). Además, se puede apreciar a partir de la curva de la concentración de compuesto en sangre vs tiempo tras la administración oral que, en comparación con los compuestos 1 y 5 (no de acuerdo con la invención), la velocidad de eliminación de los compuestos 2, 3 y 4 (de acuerdo con la invención) se aceleró obviamente cuando alcanzaron la concentración más elevada (Figura 1).

Tabla 1: Parámetros farmacocinéticos de administración oral (3 mg/kg)

Compuesto	T_{max} (h)	C_{max} (ng/ml)	AUC_{inf} (h*ng/ml)	**T1/2 (h)**	F (%)
Compuesto 1*	2,00	365 ± 51,5	6197 ± 147	**10,6 ± 1,07**	82,5
Compuesto 2	2,00	341 ± 36,2	3829 ± 184	**5,47 ± 0,63**	63,4
Compuesto 3	3,33	681 ± 61,1	8107 ± 469	**5,30 ± 0,51**	96,1
Compuesto 4	1,15	346 ± 29,6	4419 ± 449	**5,37 ± 0,15**	52,9
Compuesto 5*	3,33	249 ± 8,74	5460 ± 401	**12,3 ± 2,09**	74,0
* No de acuerdo con la invención.					

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de administración intravenosa (1 mg/kg)

Compuesto	CL (l/h/kg)	Vss (l/kg)	AUC_{inf} (h*ng/ml)	**T1/2 (h)**	MRT_{inf} (h)
Compuesto 1*	0,427 ± 0,063	4,65 ± 0,389	2376 ± 329	**8,69 ± 0,80**	11,0 ± 1,20
Compuesto 2	0,499 ± 0,039	3,12 ± 0,101	2012 ± 146	**5,47 ± 0,42**	6,28 ± 0,44
Compuesto 3	0,366 ± 0,050	2,65 ± 0,229	2767 ± 410	**5,04 ± 0,37**	5,11 ± 0,39
Compuesto 4	0,362 ± 0,026	2,75 ± 0,112	2768 ± 200	**5,29 ± 0,60**	5,23 ± 0,36
Compuesto 5*	0,454 ± 0,018	5,87 ± 0,802	2203 ± 89,5	**10,1 ± 1,02**	12,9 ± 1,24
* No de acuerdo con la invención.					

Ejemplo 7: Efecto de los compuestos proporcionados por medio de la presente invención sobre la internalización de S1P1 y S1P3.

1) Experimento de efecto de internalización sobre S1P1

Se sabe bien que los agonistas de molécula pequeña S1P1 puede evitar que los linfocitos penetren en la circulación periférica induciendo internalización de S1P1 sobre la superficie celular. Con el fin de determinar si los compuestos proporcionados por medio de la presente invención tienen actividad de inducción de internalización S1P1, se usan células CHO-S que expresan S1P1 humano, para sustituir a los linfocitos, como sistema de detección de internalización de S1P1. Para facilitar el control de S1P1 sobre la superficie celular, se funde una cola Myc al N-terminal de S1P1, analizándose de este modo la expresión de S1P1 por medio de citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos marcados con fluorescente frente a la cola Myc.

Se preparó una disolución de reserva 10 mM disolviendo el compuesto 2 proporcionado por medio de la presente invención en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y posteriormente se diluyó la disolución de reserva a diferentes concentraciones según se deseó con DMEM. Se recolectaron las células CHO-S que portan S1P1 humano con cola Myc y posteriormente se ajustaron a una densidad de un millón de células por ml gracias al medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Se mezclaron concentraciones diferentes del Compuesto 2 diluido en un volumen igual y la suspensión celular y posteriormente se incubó a 37 ºC durante 1 hora. Tras la incubación, se centrifugó la mezcla a 800 rpm durante 5 minutos para obtener las células. Se re-suspendieron las células en tampón FACS (PBS que contenía BSA al 1 %) y se añadió anticuerpo Myc marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (de Californian Miltenyi Biotec GmbH, EE.UU.) y se incubó durante 1 hora en hielo. Se lavaron las células, se re-suspendieron en tampón FACS pre-enfriado y se analizó por medio de citometría de flujo FACS Calibur.

Los datos del experimento mostraron que el compuesto 2 exhibió una actividad de inducción de internalización S1P1 de manera dependiente de la dosis (Tabla 3). También se detectaron las actividades de los compuestos 3 y 4 para inducir la internalización de S1P1 por medio del mismo método, y los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa con el compuesto 1. Esto indica que todos los compuestos obtenidos a través de sustitución con F, Cl y Br (compuestos 2, 3 y 4) todavía poseen actividad para provocar la activación de S1P1 al tiempo que tienen semividas obviamente acortadas.

2) Experimento de efecto de internalización sobre S1P3

Se usaron células CHO-S que expresaban S1P3 humano para llevar a cabo el ensayo de detección de internalización. Además de las células, el método experimental fue el mismo que el método del experimento de detección internalizada de S1P1.

Los resultados del experimento mostraron que, de forma similar al compuesto 1, los efectos de los compuestos 2, 3 y 4 sobre S1P fueron específicos, concretamente que los compuestos únicamente tuvieron un efecto de activación de internalización sobre S1P1 y no tuvieron efecto de activación de internalización alguno sobre el subtipo S1P3 (Tabla 3). Esto indica que, aunque los compuestos con sustituyente F, Cl o Br obviamente tienen una semivida in vivo acortada, en comparación con el compuesto 1, la selectividad de los compuestos frente a S1P1 diana no se ve modificada. En este sentido, los compuestos de la presente invención son diferentes de FTY720 actualmente usado en la actividad clínica, que es un agonista S1P no selectivo. FTY720 puede activar diversos receptores S1P, tales como S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5, dando como resultado de este modo una serie de efectos secundarios graves, por ejemplo, bradicardia.

Tabla 3: Actividad y selectividad de los compuestos 2, 3 y 4 frente a receptores

	Internalización de receptor (EC50)	
	S1P1	S1P3
Compuesto 1*	5,69 nM	>1000 nM
Compuesto 2	9,83 nM	>1000 nM
Compuesto 3	3,21 nM	>1000 nM
Compuesto 4	4,20 nM	>1000 nM
*No de acuerdo con la invención.		

Ejemplo 8: Efectos de los compuestos proporcionados por medio de la presente invención sobre el número de linfocitos en sangre periférica.

S1P1, que se expresa sobre la superficie de los linfocitos, resulta esencial para que los linfocitos abandonen el tejido linfoide secundario y posteriormente penetren en la circulación periférica. Los agonistas de S1P1 de molécula pequeña pueden activar el receptor y generar un efecto de internalización sobre dicho receptor. Este mecanismo es un mecanismo actualmente conocido por medio del cual se evita que los linfocitos abandonen el tejido linfoide secundario, lo cual tiene como resultado un menor número de linfocitos en la circulación periférica. Con el fin de determinar si los compuestos proporcionados por medio de la presente invención pueden reducir el número de linfocitos en sangre periférica, se lleva a cabo un experimento de efecto in vivo sobre los linfocitos.

Se preparó una cantidad apropiada de compuesto 2 en forma de suspensión con carboximetilcelulosa de sodio (CMC-Na) y se administró por vía oral a tres ratas Sprague-Dawley (SD). Se tomaron muestras de sangre (0,5 ml) 30 minutos antes de la administración y en diferentes momentos después de la administración (se colocaron las muestras de sangre recogidas en tubos EP que contenían una cantidad apropiada de disolución EDTA-2K) y se analizó directamente en un analizador celular de sangre ADVIA2120.

Los resultados del experimento mostraron que el compuesto 2 redujo el número de linfocitos en sangre periférica de manera eficaz. El número de linfocitos en sangre periférica se vio reducido obviamente 30 minutos después de la administración, y además se vio reducido en todos los instantes de toma de muestra (30, 120, 240, 360 y 480 minutos). El compuesto 2, en todas las tres dosis evaluadas, tuvo la actividad, en la que se observó una reducción de más de un 50 % de linfocitos en sangre periférica únicamente con una dosis de 0,01 mg/kg, y la reducción mayor se observó con una dosis de 1 mg/kg (Figura 2). Lo que es más, el efecto del compuesto 2 es específico para los linfocitos, y el compuesto 2 modificó el número de células mononucleares periféricas y otros leucocitos de manera no obvia.

Se encontró que el efecto del compuesto 3 (de acuerdo con la invención), 4 (de acuerdo con la invención) y 5 (no de acuerdo con la invención) sobre los linfocitos fue similar a la del compuesto 2 (de acuerdo con la invención) sometiendo a ensayo los compuestos 3, 4 y 5 con el mismo método (Figura 3 y Figura 4).

Ejemplo 9: Efecto del Compuesto 2 sobre el desarrollo de artritis tipo II inducida por colágeno en ratas Lewis.

La artritis reumática en personas es una enfermedad autoinmunitaria, en la cual el propio sistema inmunitario del paciente ataca a los tejidos de las articulaciones. Los linfocitos que incluyen células T y B juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Se sabe que la inhibición de las funciones de la célula T mediante el bloqueo de la activación de las células T es un tratamiento eficaz para la artritis reumática. Debido a que el Compuesto 2 bloquea la salida de linfocitos, resulto interesante determinar si sería eficaz a la hora de inhibir el desarrollo de artritis en el modo CIA en ratas. Para llevar a cabo el ensayo, se indujo el desarrollo de la enfermedad en ratas Lewis como se muestra a continuación. Se anestesiaron ratas con isoflurano y se inyecto por vía intradérmica un total de 0,5 ml de emulsión CII/CFA. La emulsión se inyectó en tres puntos, uno en la base de la cola (0,1 ml), y otros dos puntos (0,2 ml/punto) en la espalda de la rata cerca de la base de la cola. Se proporcionó una inyección de recuerdo idéntica por vía intradérmica a los 7 días de la inmunización principal evitando los puntos de inyección anteriores.

Se preparó el compuesto 2 en forma de suspensión en CMC-Na al 0,5 % y se administró por vía oral a las ratas en el momento de la inyección CII/CFA. Se administró por vía oral TOFACITINIB al grupo de control positivo 12 días después de la sensibilización. Se puntuó la gravedad de artritis en las cuatro patas, 2 veces por semana, comenzando a los 7 días después de la sensibilización. Los criterios son los siguientes: puntuación 0: sin evidencia de eritema e hinchamiento; puntuación 1: eritema e hinchamiento leve confinado a la curvatura plantar (tarso) o la articulación del tobillo; puntuación 2: eritema e hinchamiento leve que se extiende desde el tobillo hasta la curvatura plantar; puntuación 3: eritema e hinchamiento moderado que se extiende desde el tobillo hasta las articulaciones del metatarso; puntuación 4: eritema e hinchamiento grave que abarca tobillo, pie y dedos. Se determinó el hinchamiento de la articulación, medido por medio del volumen de las patas posteriores usando un Plethysmómetro, en el Dia 0, y después 2 veces por semana a partir del Día 7 hasta el Día 28. Se determinó la destrucción de la articulación por medio de examen de rayos-X el Dia 28. Los resultados mostraron que a 1 mg/kg, el Compuesto 2 resultó eficaz a la hora de inhibir el desarrollo de artritis, basándose en el hinchamiento de la articulación (Figura 5) y la destrucción de la estructura de la articulación (Figura 6). Se puede apreciar a partir de la Figura 5 que el Compuesto 2 tuvo una función similar con TOFACITINIB, pero la dosificación del mismo disminuyó de forma significativa.

Ejemplo 10: Efecto del Compuesto 2 sobre el desarrollo de encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE).

Se ha comprobado que los agonistas S1P1 son eficaces en la esclerosis múltiple humana y en modelos con animales de MS. Se evaluó la eficacia del Compuesto 2 en cuanto a encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo de ratón de esclerosis múltiple humana. Se asignaron aleatoriamente ocho ratones C57BL/6 hembra a ocho grupos basándose en el peso corporal y se inmunizaron en el presente estudio. Cada grupo consistió en diez (10) ratones. Para inducir la enfermedad, se disolvió MOG 35-55 (MOG, glicoproteína de oligo-dendrocito de mielina) en disolución salina hasta una concentración de 2 mg/ml, y se emulsionó en Coadyuvante De Freund completo modificado (CFA). Se anestesiaron los ratones con isoflurano y posteriormente se inyectaron 100 µl de emulsión, por vía subcutánea, en las espaldas afeitadas de los mismos en tres puntos, uno a lo largo de la línea media de la espalda

entre los hombros, y dos en cada lado de la línea media sobre la espalda inferior. Se administró i.p. toxina Pertuxus (200 ng en 200 µl de PBS), un día después de la inmunización y 48 horas después para todos los grupos. Se evaluó el desarrollo de EAE mediante la puntuación clínica de los ratones una vez al día desde el Día 0 hasta el Dia 30 después de la inmunización.

Se administró el Compuesto 2 preparado como suspensión de Na CMC, por vía oral, partiendo del momento de la inmunización con MOG y se continuó durante todo el estudio. Los datos mostraron que a las tres dosificaciones evaluadas (0,03, 0,1 y 1 mg/kg), el Compuesto 2 inhibió de manera eficaz el desarrollo de EAE (Figura 7).

Ejemplo 11: Efecto del Compuesto 2 sobre la función cardiovascular de perros beagle

FTY720 es un agonista S1P1 no selectivo que se ha comprobado que presenta diversos efectos cardiovasculares que incluyen bradicardia en seres humanos. Para determinar si el Compuesto 2 tiene un efecto sobre la frecuencia cardíaca y el intervalo QT, se evaluó el compuesto en un ensayo de telemetría en un perro beagle consciente.

Se preparó una cantidad apropiada de CMC-Na en forma de disolución de CMC-Na al 0,5 % (peso/volumen) con agua esterilizada para inyección. Se preparó la disolución un día antes de la administración.

Se prepararon disoluciones del Compuesto 2 (muestras) con la concentración de 2, 6 y 20 mg/ml un día antes de la administración como se muestra a continuación. Se añadió una cantidad apropiada de Compuesto 2 en una cantidad apropiada de disolución de CMC-Na al 0,5 %. Se emulsionó la mezcla obtenida y se homogeneizó sobre una máquina de emulsionado isotrópica. Las concentraciones teóricas del Compuesto 2 en las disoluciones de muestra preparadas fueron 2, 6 y 20 mg/ml.

Se usaron un total de 8 animales y un diseño experimental cuadrado de Latino Doble en el presente experimento. Se separaron los ciclos de administración 3-5 días. Se pesaron los animales un día antes de cada ciclo de administración, y se mantuvieron en ayuno durante la noche. Al día de la administración, se encendió el sistema de telemetría (sistema 1 de telemetría de señal fisiológica implantable, Data Science International Inc., EE.UU.), se ajustaron los parámetros de ensayo, se activaron los implantes y se registraron los índices fisiológicos de los animales. Aproximadamente dos horas después del encendido del sistema, se administró a los animales de acuerdo con los ciclos diseñados. Se recogieron los datos de índice de tensión arterial, electrocardiograma, temperatura corporal y similares de los animales 24 horas de la administración. Durante la recogida, se apagó el sistema de forma apropiada y se encendió de nuevo con el fin de evitar un posible sobre-flujo de datos. El proceso de conmutación no afectó al valor de ajuste de los puntos de datos y se registró el número de veces de conmutación del sistema. Al día siguiente de completar el registro, se apagó el sistema de telemetría. Los instantes de detección son: 1 hora antes de la administración (-1 h), y 0,5 h (± 5 minutos), 1 h (± 10 minutos), 1,5 h (± 10 minutos), 2 h (± 15 minutos), 3 h (± 15 minutos), 4 h (± 15 minutos), 8 h (± 45 minutos), 24 h (± 1 h) después de la administración. Todos los datos se recogieron por medio del soporte lógico PONEMAH Versión 4.8 de forma automática. Los parámetros se analizaron usando una configuración artificial tras completar la recogida. En primer lugar, se analizaron los datos por medio del soporte lógico PONEMAH Versión 4.8 de forma automática, y posteriormente se chequearon punto por punto de forma artificial para los valores seleccionados. Como para el caso de los índices de frecuencia cardíaca, tensión arterial, respiración y temperatura corporal, se seleccionaron los valores medios de longitud de onda continua en 1 minuto, y se seleccionaron los valores medios de longitud de onda en 10 segundos para los otros índices de electro-cardio. Durante la selección de los valores, se prefieren los datos inmediatos en los instantes de detección. No obstante, si hubiera problemas tales como grandes molestias debidas a ruido, irregularidades en la frecuencia cardíaca, o no fuera posible identificar la longitud de onda de forma clara en los instantes de detección, se selecciona la longitud de onda con una señal clara en el intervalo concreto. Además, si la longitud de onda clara en el intervalo concreto no estuviera disponible para el análisis, se deberían encontrar datos disponibles para el análisis alrededor de los puntos del valor, lo cual se debería explicar especialmente en una tabla de puntos de valor. Se registró el tiempo en el que se seleccionaron los valores.

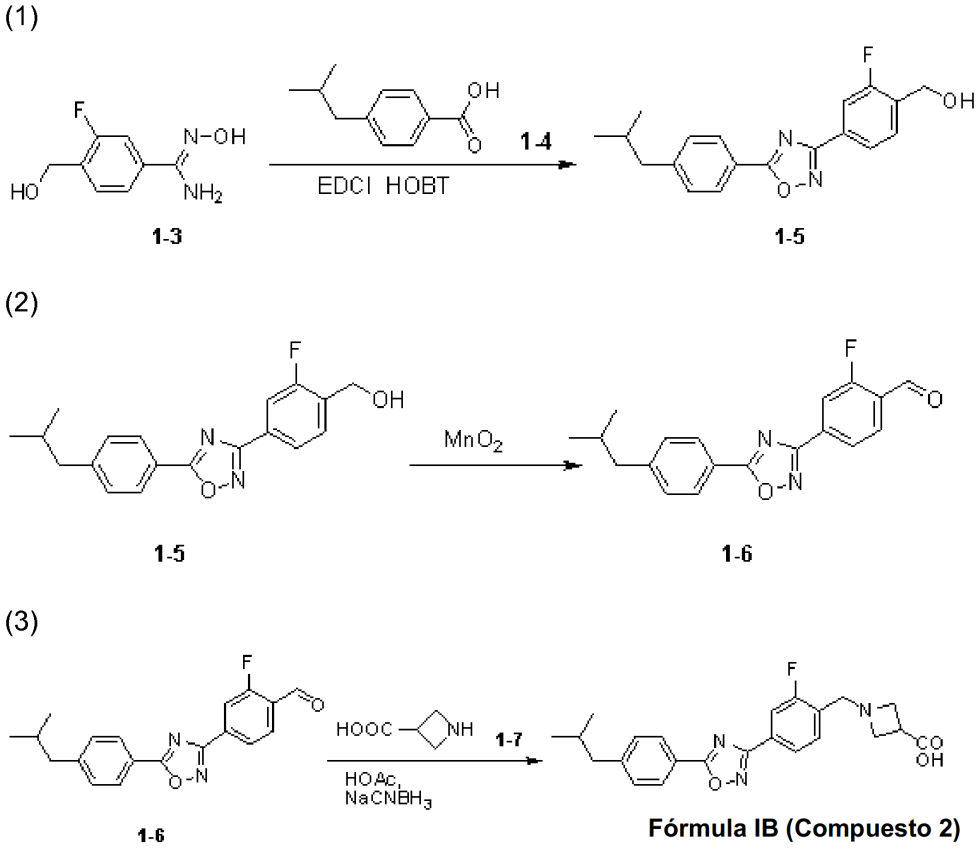
Se usó el soporte lógico estadístico SPSS13.0 para procesar los datos en el presente experimento. Se llevaron a cabo análisis de dos variables de manera que se ajustó el nivel de significación en $p < 0,05$. Se expresaron los índices de tensión arterial, electrocardiograma, respiración y temperatura corporal como "media ± error estándar" y posteriormente se analizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: en primer lugar, se lleva a cabo un ensayo de homogeneidad sobre los datos por medio del uso del Ensayo de Levene, y en caso de datos uniformes ($P > 0,05$), se lleva a cabo un análisis de varianza de factor único; y si el resultado del análisis de varianza es significativo ($P \leq 0,05$), se lleva a cabo una comparación múltiple de Dunnett en base a la diferencia entre el grupo de vehículo y el grupo de muestra. Si el resultado del Ensayo de Levene es significativo ($P \leq 0,05$), se lleva a cabo un ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis; y si el resultado del ensayo no paramétrico de Kruskall-Wallis es significativo ($P \leq 0,05$), se lleva a cabo una comparación por parejas mediante un ensayo de U de Mann-Whitney.

Se calcula el intervalo de cambio una vez que se han normalizado los datos recogidos en los instantes con diferencia significativa o tendencia de cambio significativo. La fórmula de normalización es: $\% \Delta = [(b1-b0)-(a1-a0)]/a1x100$, en la que b1 representa el valor del instante tras la administración de las muestras, b0 representa el valor del instante antes de la administración de las muestras, a1 representa el valor correspondiente del instante tras la administración del vehículo, a0 representa el valor del instante antes de la administración del vehículo, y % Δ representa el intervalo de cambio.

Comparando la frecuencia cardíaca, el intervalo QT y el intervalo QTcF de animales a los cuales se había administrado dosis de muestra con respecto a los índices de electrocardiograma de animales a los cuales se había administrado vehículo, no se encontró diferencia significativa (P > 0,05) o tendencia de cambio (Figura 8A a Figura 8C).

Como método de síntesis de ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico (Compuesto 2), a continuación, se proporcionan Ejemplos de optimización del método y su condición.

La síntesis del compuesto 2 se lleva a cabo de acuerdo con el método que incluye las siguientes etapas:



Ejemplo 12: Evaluación de la etapa (1) en el método de síntesis de la presente invención.

Se preparó producto bruto del compuesto representado por medio de la fórmula 1-5 y se caracterizó de acuerdo con el Ejemplo 2. La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 77,25 %.

Se llevó a cabo una evaluación de la condición de purificación por cristalización sobre el producto bruto preparado. La operación de cristalización fue como se muestra a continuación: se disuelve el producto bruto en un disolvente de cristalización, se cristaliza a 20 ºC, y se seca a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5 que es un producto sólido casi blanco. Se detectó la pureza por medio de LCMS.

En primer lugar, se llevó a cabo la operación de cristalización anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 4 para la evaluación del disolvente de cristalización preferido.

Tabla 4: Evaluación de disolventes y su cantidad en cuanto a purificación por cristalización

Disolvente	Cantidad de disolvente (producto bruto:disolvente)	Pureza de producto bruto	Pureza de producto puro	Rendimiento de purificación
Acetato de etilo	1 g: 1 ml	77,25 %	96,72 %	Pequeña cantidad de precipitados
Acetona	1 g: 1 ml	77,25 %	95,22 %	Pequeña cantidad de precipitados

Metanol	1 g: 3 ml	77,25 %	99,08 %	55,4 %
Etanol	1 g: 3 ml	77,25 %	99,36 %	37,4 %
Tetrahidrofurano	1 g: 1 ml	77,25 %		Disolución transparente
Diclorometano	1 g: 1 ml	77,25 %	98,58 %	Pequeña cantidad de precipitados
Agua	1 g: 1 ml	77,25 %	95,34 %	84 %

Se puede apreciar en la Tabla 4 que, cuando se usa un disolvente único para la cristalización, aumenta la pureza del producto obviamente mediante el uso de metanol o etanol como disolvente. El rendimiento es mucho más elevado cuando se usa metanol que cuando se usa etanol, pero es únicamente de un 55,4 %. La pureza del producto no aumenta sustancialmente mediante el uso de agua como disolvente, pero la pérdida de rendimiento es menor. Por tanto, se intenta en el estudio de seguimiento usar un disolvente mixto de metanol y agua como disolvente de cristalización.

En segundo lugar, la operación de cristalización anterior se lleva a cabo de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 5 para evaluar la relación preferida de metanol y agua en el disolvente mixto. La relación de producto bruto (en g, en peso) con respecto al disolvente mixto (en ml, en volumen) para la cristalización es de 1:5.

Tabla 5: Evaluación de la relación de metanol y agua en el disolvente mixto

Disolvente	Relación de disolvente (relación en volumen)	Pureza de producto bruto	Pureza de producto puro	Rendimiento de purificación
Metanol y agua	1: 1	77,25 %	98,32 %	75,2 %
Metanol y agua	2: 1	77,25 %	99,13 %	73,1 %
Metanol y agua*	3: 1	77,25 %	99,27 %	72,7 %
Metanol y agua	1: 2	77,25 %	97,20 %	79,8 %
Metanol y agua	1: 3	77,25 %	95,68 %	83,2 %
* De acuerdo con la invención.				

Se puede apreciar a partir de la Tabla 5 que la pureza del producto aumenta, pero el rendimiento disminuye al aumentar la cantidad de metanol en el disolvente mixto; y el rendimiento de purificación aumenta, pero la pureza de producto disminuye al aumentar la cantidad de agua. Considerando en términos globales, se escogió una relación en volumen de 3:1 como relación de metanol y agua en el disolvente mixto.

En tercer lugar, se lleva a cabo la operación de cristalización anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 6 para evaluar la cantidad de disolvente mixto. La relación en volumen de metanol y agua en el disolvente mixto es de 3:1.

Tabla 6: Evaluación de la cantidad de disolvente

Disolvente	Cantidad de disolvente (producto bruto:disolvente)	Pureza de producto bruto	Pureza de producto puro	Rendimiento de purificación
Metanol y agua	1 g: 3 ml	77,25 %	98,99 %	69,9 %

Disolvente	Cantidad de disolvente (producto bruto:disolvente)	Pureza de producto bruto	Pureza de producto puro	Rendimiento de purificación
Metanol y agua*	1 g: 5ml	77,25 %	99,16 %	72,2 %
Metanol y agua	1 g: 10 ml	77,25 %	99,05 %	68,9 %
Metanol y agua	1 g: 20 ml	77,25 %	99,30 %	67,2 %
* De acuerdo con la invención.				

Se puede apreciar a partir de la Tabla 6 que se obtiene una pureza y rendimiento elevados cuando la relación de peso de producto bruto con respecto a volumen de disolvente es de 1 g:5 ml. No obstante, aunque se obtenga una pureza más elevada cuando la relación en peso de producto bruto con respecto a volumen es de 1 g:20 ml, en comparación a cuando la relación es de 1 g:5 ml, el rendimiento es menor. Por tanto, se selecciona una relación de 1 g: 5 ml como relación en peso de producto bruto con respecto a disolvente usado como sistema de disolvente para la cristalización.

Ejemplo 13: Evaluación de la etapa (2) en el método de síntesis de la presente invención

Se llevó a cabo la etapa (2) de la presente invención de acuerdo con el siguiente procedimiento: se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5 purificado a partir del Ejemplo 1 en un disolvente de reacción, y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo. El líquido de reacción se calentó a reflujo y continuó la reacción. Se enfrió la reacción a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído representado por medio de la fórmula 1-6 que fue un producto sólido blanco. Se detectó la tasa de conversión por medio de LCMS.

En primer lugar, se llevó a cabo la etapa de síntesis anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 7 para evaluar el disolvente de reacción preferido. La relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso es de 1:6. La expresión "materia prima" en las Tablas 7-9 hace referencia a alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5.

Tabla 7: Evaluación del disolvente de reacción

Disolvente	Cantidad de disolvente (materia prima:disolvente)	Tiempo de reacción	Tasa de conversión (LCMS)	Rendimiento
Tetrahidrofurano	1 g:10 ml	1 h	96,26 %	92,2 %
Acetato de etilo*	1 g:10 ml	1 h	93,3 %	93,3 %
Tolueno	1 g:10 ml	1 h	91,7 %	91,7 %
* De acuerdo con la invención.				

Se puede apreciar a partir de la Tabla 7 que existe un pequeño efecto sobre la tasa de conversión y el rendimiento cuando se usa tetrahidrofurano, acetato de etilo o tolueno como disolvente de reacción. No obstante, existió riesgo de seguridad cuando se usó tetrahidrofurano como disolvente de reacción y elevada toxicidad cuando se usó tolueno como disolvente de reacción, de este modo, se escogió acetato de etilo como disolvente de reacción.

En segundo lugar, se llevó a cabo la etapa de síntesis anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 8 para evaluar la cantidad preferida de disolvente. Se usó acetato de etilo como disolvente de reacción, y la relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso fue de 1:6.

Tabla 8: Evaluación de la cantidad de disolvente de reacción

Cantidad de disolvente (materia prima:disolvente)	Tiempo de reacción	Tasa de conversión (LCMS)	Rendimiento
1 g:10ml*	1 h	97,76 %	93,3 %
1 g:20 ml	1 h	98,93 %	92,6 %
1 g:30 ml	1 h	98,83 %	93,1 %
* De acuerdo con la invención.			

Se puede apreciar a partir de la Tabla 8 que existió un pequeño efecto sobre la tasa de conversión y el rendimiento cuando la relación de peso de la materia prima con respecto al volumen de disolvente fue de 1 g:10 ml, 1 g:20 ml y 1 g:30 ml. Considerando el coste, se seleccionó la relación de 1g:10 ml como la cantidad de disolvente de reacción.

En tercer lugar, se llevó a cabo la etapa de síntesis anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 9 para evaluar la cantidad preferida de dióxido de manganeso. Se usó una cantidad de 1 g:10 ml de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico representado por medio de la fórmula 1-5 con respecto a acetato de etilo.

Tabla 9: Evaluación de la cantidad de oxidante

Cantidad de oxidante (relación molar de materia prima con respecto a dióxido de manganeso)	Tiempo de reacción	Tasa de conversión (LCMS)	Rendimiento
1:4	3 h	96,91 %	86,6 %
1:5	3 h	97,06 %	91,0 %
1:6*	3 h	97,03 %	93,3 %
1:10	3 h	97,12 %	93,6 %
* De acuerdo con la invención.			

Se puede apreciar a partir de la Tabla 9 que se obtuvieron una elevada tasa de conversión y rendimiento cuando la relación molar de materia prima con respecto a dióxido de manganeso fue de 1:6. No obstante, existe un pequeño efecto sobre la tasa de conversión y el rendimiento cuando la relación molar de materia prima con respecto a dióxido de manganeso aumentó hasta 1:10. Por tanto, considerando tanto el coste como el rendimiento, la relación molar de 1:6 se escogió como la cantidad de materia prima y dióxido de manganeso.

Ejemplo 14: Evaluación de la etapa (3) en los métodos de síntesis de la presente invención. La etapa (3) de la presente invención se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

A temperatura ambiente, se añadió 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído de fórmula 1-6, ácido acetidin-3-carboxílico de fórmula 1-7 y ácido acético glacial al disolvente de reacción y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN en metanol, y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se agitó el líquido de reacción para reaccionar a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico representado por medio de la fórmula IB (compuesto 2) que fue un producto sólido blanco. Se detectó la tasa de conversión por medio de LCMS.

En primer lugar, se llevó a cabo la etapa de síntesis anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 10 para evaluar el disolvente de reacción preferido. La relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil),1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído de fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico de fórmula 1-7 fue de 1:1,05; la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído de fórmula 1-6 con respecto a cianoborohidruro de sodio es de 1:1, la temperatura de adición gota a gota de la disolución de NaBH3CN en metanol fue de 15-20 ºC; y la expresión "materia prima" en las Tablas 10-12 hace referencia a 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído representado por medio de la fórmula 1-6.

Tabla 10: Evaluación del disolvente de reacción

Disolvente	Cantidad de disolvente (materia prima:disolvente)	Tiempo de reacción	Tasa de conversión (LCMS)	Rendimiento
Tetrahidrofurano	1 g:40 ml	6 h	1,64 %	
Metanol*	1 g:40 ml	6 h	79,26 %	69,10 %
Etanol	1 g:40 ml	6 h	66,20 %	53,23 %
* De acuerdo con la invención.				

Se puede apreciar a partir de la Tabla 10 que la tasa de conversión fue muy baja cuando se usó tetrahidrofurano como disolvente de reacción. Al mismo tiempo tanto la tasa de conversión como el rendimiento fueron elevados cuando se usó metanol o etanol como disolvente de reacción.

En segundo lugar, se llevó a cabo la etapa de síntesis anterior de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 11 para evaluar la cantidad preferida de agente de reducción. La relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído de fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico de fórmula 1:7 fue de 1:1,05; el disolvente de reacción fue metanol y la temperatura de adición gota a gota de la disolución de NaBH3CN en metanol fue de 15-20 ºC.

Tabla 11: Evaluación de la cantidad de agente reductor

Cantidad de agente reductor (relación molar de materia prima con respecto a cianoborohidruro de sodio)	Tiempo de reacción	Tasa de conversión (LCMS)	Rendimiento	Pureza
1:0,5	15 h	66,42 %	67,20 %	94,58 %
1:1*	15 h	79,26 %	69,10 %	95,50 %
1:2	15 h	73,77 %	65,61 %	94,24 %
1:6	15 h	64,51 %	53,27 %	94,36 %
* De acuerdo con la invención.				

Se puede apreciar a partir de la Tabla 11 que la tasa de conversión, el rendimiento y la pureza del producto fueron todos más elevados cuando la relación molar de materia prima con respecto a cianoborohidruro de sodio fue de 1:1.

En tercer lugar, la etapa de síntesis anterior se llevó a cabo de acuerdo con los contenidos listados en la Tabla 12, para evaluar la temperatura de adición gota a gota preferida del agente reductor. La relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído de fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico de fórmula 1-7 fue de 1:1,05; y el disolvente de reacción fue metanol.

Tabla 12: Evaluación de la temperatura de adición gota a gota del agente reductor

Temperatura	Cantidad de agente reductor (materia prima (1-6):agente reductor)	Cantidad de disolvente (materia prima:disolvente)	Tiempo de adición gota a gota	Tasa de conversión	Pureza
0-5 °C	1 Eq.	40 V	20 min	67,65 %	95,61 %
5-15 °C	1 Eq.	40 V	20 min	71,04 %	96,91 %

15-20 °C*	1 Eq.	40 V	20 min	74,50 %	97,91 %
* De acuerdo con la invención.					

Se puede apreciar a partir de la Tabla 12 que tanto la tasa de conversión como la pureza del producto fueron mayores cuando la temperatura de adición gota a gota de cianoborohidruro de sodio fue de 15-20 ºC.

Ejemplo 15: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutílico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 256 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,28 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 3:1), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 182 g, 71 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 93,1 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (1,4 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,21 kg, 2,42 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 139 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 97,6 %.

MS (ESI): m/z 325,0 $[M+H]^+$. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (11,5 g, 0,185 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 67 g, 89,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 98,8 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 16: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 1,477 kg, 8,30 moles) en N,N-dimetilformamida (17 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (1,12 kg, 8,30 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,58 kg, 8,30 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 1,527 kg, 8,30 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (20 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (15 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 2,6 kg de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 12,5 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 3:1), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-

4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 1,9 kg, 73 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 93,89 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 1,4 kg, 4,30 moles) en acetato de etilo (14 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (2,1 kg, 24,15 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 1,38 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 93,94 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 0,6 kg, 1,85 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 0,195 kg, 1,93 moles) y ácido acético glacial (0,360 l, 6,3 moles) a metanol (16 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (0,115 kg, 1,85 moles) en metanol (2 l), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 3 l de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 0,7 kg, 92,6 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 97,6 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 17: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 251 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,28 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 1:1), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 158 g, 63 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 92,1 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (1,4 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,19 kg, 2,15 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 138 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 98,5 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12~7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (5,8 g, 0,09 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para

obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 62 g, 81,9 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 94,6 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 18: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 260 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,30 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 1:3), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 196 g, 76 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 88,7 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (1,4 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,21 kg, 2,42 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 139 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 97,7 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (23,0 g, 0,37 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2,60 g, 79 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 94,2 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 19: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 250 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,25 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 2:1), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 169 g, 68 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 93,9 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (1,4 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,37 kg, 4,3 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 139 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 99,2 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (69,0 g, 1,11 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 2, 54 g, 71,2 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 94,4 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 20: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 256 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,28 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 1:2), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 190 g, 74 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 92,6 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (1,4 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,15 kg, 1,72 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 139 g, 99,0 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 96,9 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (11,5 g, 0,185 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 64 g, 84,4 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 95,5 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

Ejemplo 21: Método de síntesis de la presente invención

(1) A temperatura ambiente, se disolvió ácido 4-isobutilbenzoico (**1-4**, 0,148 kg, 0,83 moles) en N,N-dimetilformamida (1,7 l) y posteriormente se añadieron 1-hidroxibenzotriazol (0,11 kg, 0,83 moles) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,16 kg, 0,83 moles). Se calentó el líquido de reacción a 30 ºC y se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina (**1-3**, 0,153 kg, 0,83 moles) al líquido de reacción. Se calentó el líquido de reacción a 140 ºC y se hizo reaccionar durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se retiró N,N-dimetilformamida por medio de concentración a presión reducida. Se disolvió el concentrado en acetato de etilo (2,0 l) y se lavó sucesivamente con agua (1,5 lx2) y disolución de NaHCO3 saturada (1,5 l). Se recogió la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, y se concentró a presión reducida para obtener 258 g de producto bruto.

El producto bruto obtenido a partir de lo anterior se recristalizó por medio de 1,29 l de disolvente mixto de metanol y agua (una relación en volumen de 3:1), se cristalizó a 20 ºC, se filtró y se secó a vacío para obtener alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que fue un producto sólido casi blanco (**1-5**, 186 g, 72 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 93,8 %.

MS (ESI): m/z 327,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,11 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,98 (m, 1H), 7,86 (m, 1H), 7,59 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,33 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,85 (s, 2H), 2,57 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,8 Hz, 6H).

(2) A temperatura ambiente, se disolvió alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico (**1-5**, 0,14 kg, 0,43 moles) en acetato de etilo (2,8 l) y posteriormente se añadió dióxido de manganeso activo (0,21 kg, 2,42 moles). Se calentó el líquido de reacción a reflujo y se hizo reaccionar durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. Se recogió un filtrado amarillo claro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que fue un producto sólido blanco (**1-6**, 138 g, 99 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 98,8 %.

MS (ESI): m/z 325,0 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 10,42 (s, 1H), 8,12-7,99 (m, 5H), 7,34 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 2,58 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 1,93 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,4 Hz, 6H).

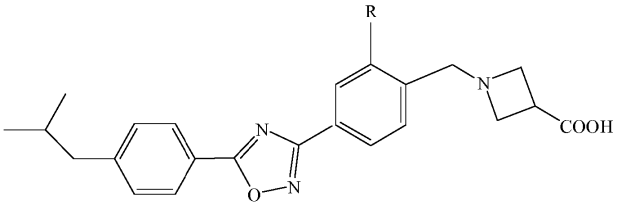
(3) A temperatura ambiente, se añadieron 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído (**1-6**, 60 g, 0,185 moles), ácido acetidin-3-carboxílico (**1-7**, 19,5 g, 0,193 moles) y ácido acético glacial (360 ml, 0,63 moles) a metanol (1,6 l) y se agitó durante 2 horas a 20 ºC. Se disolvió NaBH3CN (11,5 g, 0,185 moles) en metanol (200 ml), y posteriormente se añadió gota a gota la disolución de NaBH3CN en metanol al sistema de reacción en 1 hora. Se controló la temperatura de adición gota a gota en 15-20 ºC. Se agitó el líquido de reacción durante 16 horas a 20 ºC tras la adición gota a gota y se filtró. Se lavó la torta filtrante con 300 ml de metanol y posteriormente se secó para obtener ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin carboxílico que fue un producto sólido blanco (compuesto 2, 64 g, 84,5 % de rendimiento). La pureza detectada por medio de LCMS fue de un 96,9 %.

MS (ESI): m/z 410,2 [M+H]+. RMN: RMN ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ: 8,13 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,05 (m, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68 (t, J = 8,0 Hz, 7,6 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,15 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 2,61 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 1,95 (m, 1H), 0,94 (d, J = 7,2 Hz, 6H).

No se pretende que la descripción anterior de las realizaciones de la presente invención limite la presente invención, y los expertos en la técnica pueden preparar diversos cambios y variaciones de acuerdo con la presente invención, los cuales se encuentran dentro del alcance de protección de la presente invención. El alcance de protección viene determinado por medio de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto como se muestra en la Fórmula I:



Fórmula I

en la que R es halógeno.

2.- El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R es F, Cl o Br.

3.- El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección con mediación de S1P1.

4.- El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad o afección está seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enteritis inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria crónica, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumor sólido, enfermedad asociada a angiogénesis, enfermedad de los vasos sanguíneos, dolor, enfermedad vírica aguda, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente o no dependiente de insulina y otras enfermedades inmunológicas relacionadas; preferentemente, dicha afección o enfermedad está seleccionada entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enteritis inflamatoria y soriasis.

5.- Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

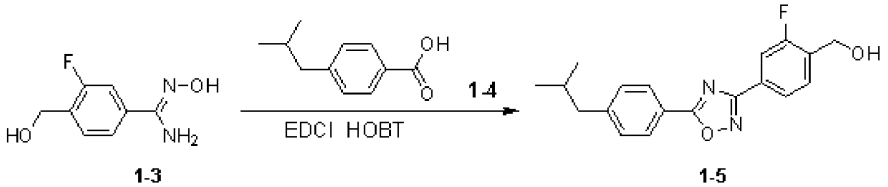
6.- La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica está en forma de comprimido, supositorio, comprimido dispersable, comprimido con revestimiento entérico, comprimido masticable, comprimido de desintegración oral, cápsula, agente revestido con azúcar, gránulo, polvo seco, disolución oral, aguja pequeña para inyección, polvo liofilizado o disolución parenteral de gran volumen para inyección; preferentemente el vehículo farmacéuticamente aceptable está seleccionado entre el grupo que consiste en diluyentes, agentes de disolución, agentes desintegrantes, agentes de suspensión, lubricantes, aglutinantes, materiales de relleno, agentes aromatizantes, edulcorantes, antioxidantes, tensioactivos, conservantes, agentes de envasado y pigmentos.

7.- El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección con mediación de S1P1, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto o composición farmacéutica; preferentemente en el que dicho sujeto es un mamífero.

8.- El compuesto o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad o afección está seleccionada entre el grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enteritis inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria crónica, asma, neuropatías inflamatorias, artritis, trasplante, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, soriasis, lesión de isquemia-reperfusión, tumor sólido, enfermedad asociada a angiogénesis, enfermedad de los vasos sanguíneos, dolor, enfermedad vírica aguda, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes mellitus dependiente o no dependiente de insulina y otras enfermedades inmunológicas relacionadas; preferentemente, dicha enfermedad o afección está seleccionada entre el grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enteritis inflamatoria y soriasis.

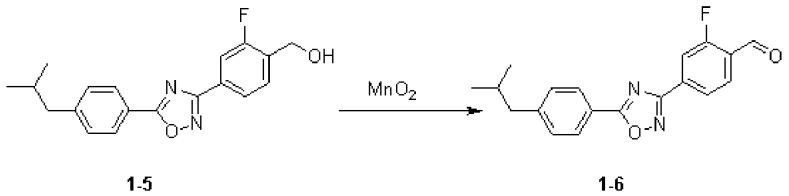
9.- Un método de síntesis del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R es F, siendo dicho compuesto ácido 1-{2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencil}-3-acetidin-carboxílico, comprendiendo dicho método de síntesis las siguientes etapas:

(1) hacer reaccionar 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 con ácido 4-isobutilbenzoico que se muestra en la fórmula 1-4, en presencia de agentes de condensación clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol para generar alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5:



y purificar el producto bruto obtenido tras la generación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 a través de cristalización, en el que el disolvente de cristalización utilizado es una mezcla de metanol y agua con una relación de 3:1 en volumen, y la relación de producto bruto (en g, en peso) con respecto a disolvente de cristalización (en mol, en volumen) es de 1:5;

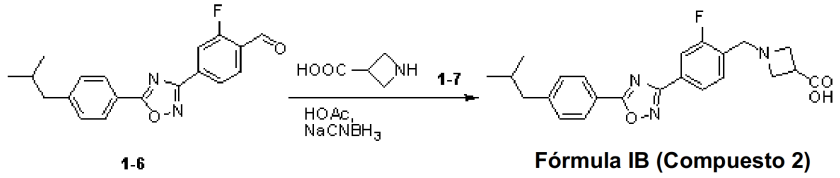
(2) hacer reaccionar el alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 obtenido en la etapa (1) con dióxido de manganeso para generar 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6:



;

en la que la reacción se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es acetato de etilo, la relación de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 (en g, en peso) con respecto al disolvente de reacción (en ml, en volumen) es de 1:10, y la relación molar de alcohol 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-bencílico que se muestra en la fórmula 1-5 con respecto a dióxido de manganeso es de 1:6;

(3) hacer reaccionar el 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 obtenido en la etapa (2) con ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 mediante el uso de ácido acético como catalizador y cianoborohidruro de sodio como agente reductor para generar el compuesto que se muestra en la fórmula IB:



;

en la que la reacción se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es metanol, la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a cianoborohidruro de sodio es 1:1, y el cianoborohidruro de sodio se disuelve en metanol y se añade gota a gota sobre el sistema de reacción a una temperatura de 15-20 ºC.

10.- El método de síntesis de acuerdo con la reivindicación 9, en el que en la etapa (1), la cristalización se lleva a cabo a 20 ºC.

11.- El método de síntesis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10,

(a) en el que la reacción de la etapa (1) se lleva a cabo en un disolvente de reacción que es uno o más seleccionado entre acetonitrilo, N-metilpirrolidona y N,N-dimetilformamida; la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 80-140 ºC; y la relación molar de 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 y el ácido 4-isobutilbenzoico que se muestra en la fórmula 1-4 es de 1:1-2,0, y/o

(b) en el que en la etapa (1), el disolvente de reacción es N,N-dimetilformamida; preferentemente, la temperatura de reacción es de 130-140 ºC; preferentemente, la relación molar de 3-fluoro-N´-hidroxi-4-hidroximetil benzamidina que se muestra en la fórmula 1-3 con respecto a ácido 4-isobutilbenzoico que se muestra en la fórmula 1-4 es de 1:1-1,5, más preferentemente de 1:1-1,2.

12. El método de síntesis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que en la etapa (2), la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 40-70 ºC, preferentemente de 60-70 ºC.

13.- El método de síntesis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que en la etapa (3), la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 es de 1:1-1,2, y la reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0-30 ºC durante un período de reacción de 1-16 horas.

14.- El método de síntesis de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que en la etapa (3), la relación molar de 2-fluoro-4-[5-(4-isobutilfenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]-benzaldehído que se muestra en la fórmula 1-6 con respecto a ácido acetidin-3-carboxílico que se muestra en la fórmula 1-7 es de 1:1-1,1, más preferentemente de 1:1; preferentemente, la temperatura de reacción es de 10-20 ºC, más preferentemente de 15-20 ºC; preferentemente, el período de reacción es de 4-16 horas.

Fig. 1A

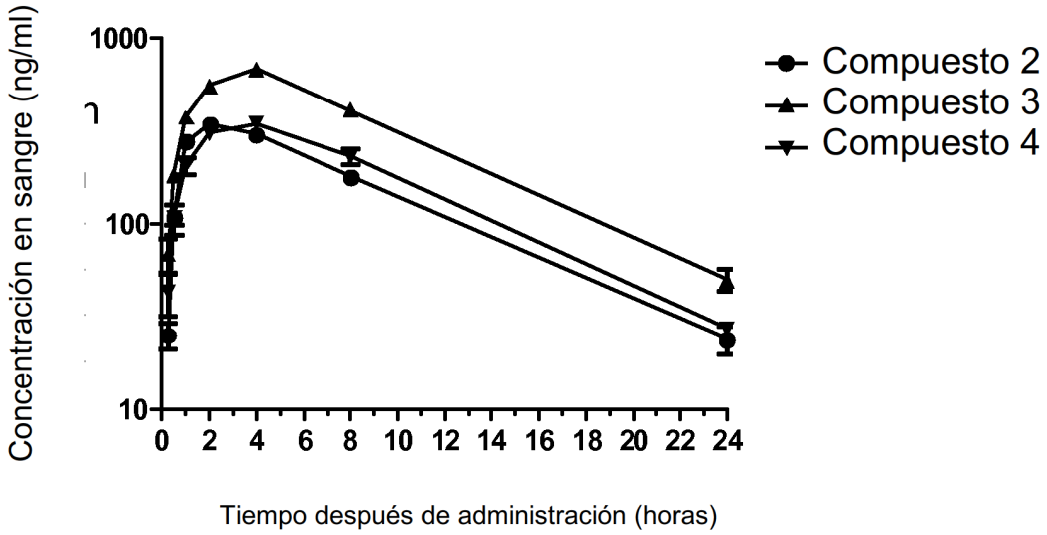

Concentración en sangre (ng/ml)
1000
100
10
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo después de administración (horas)
Compuesto 2
Compuesto 3
Compuesto 4

Fig. 1B

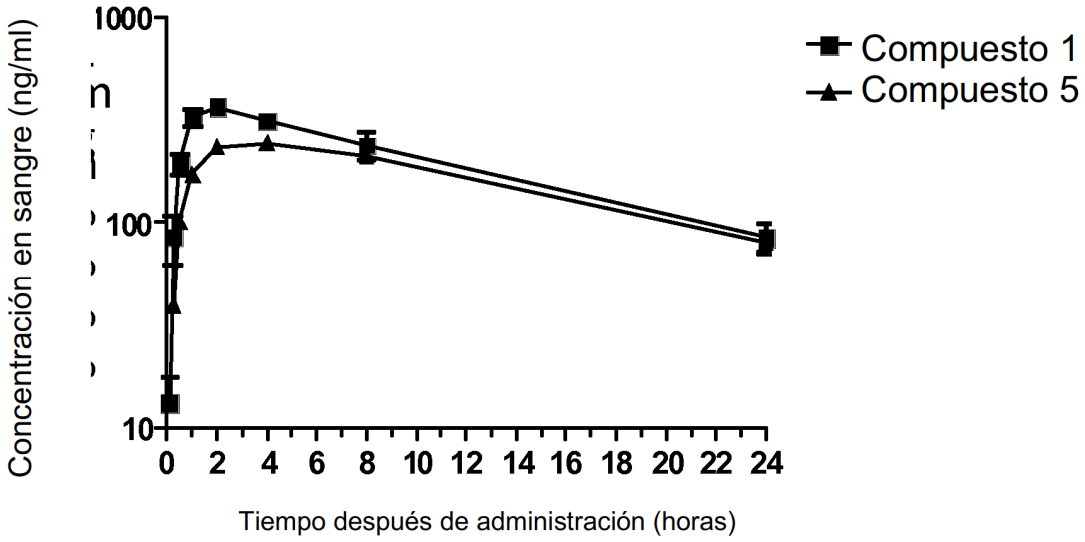

Concentración en sangre (ng/ml)
1000
100
10
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
Tiempo después de administración (horas)
Compuesto 1
Compuesto 5

Fig. 2

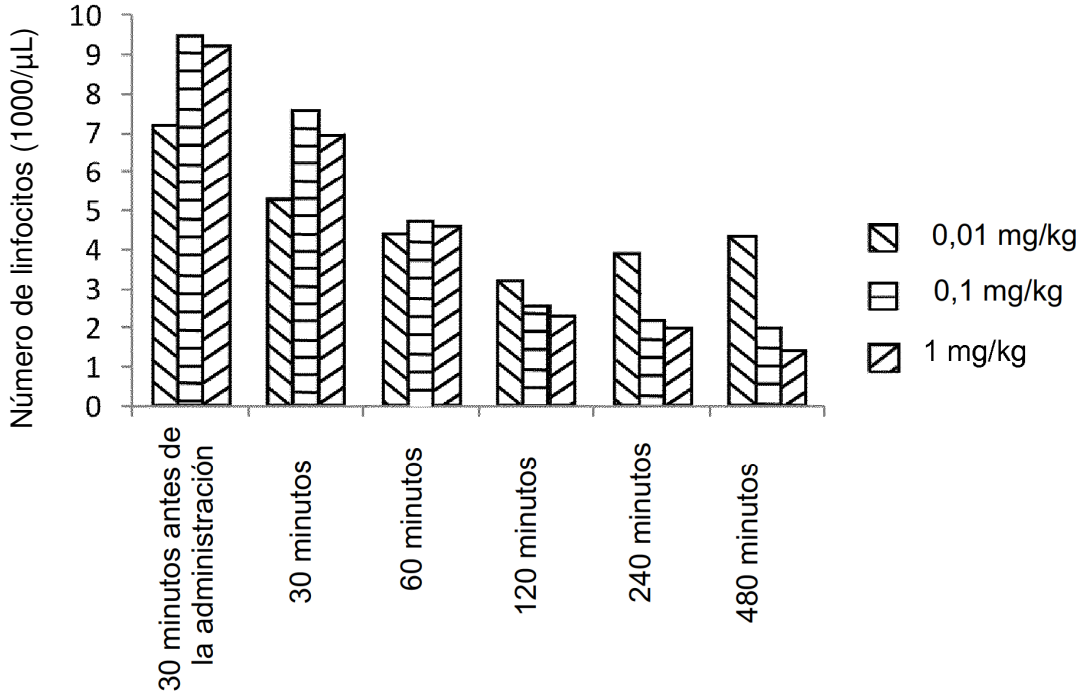

Número de linfocitos (1000/µL)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
30 minutos antes de la administración
30 minutos
60 minutos
120 minutos
240 minutos
480 minutos
0,01 mg/kg
0,1 mg/kg
1 mg/kg

Fig. 3

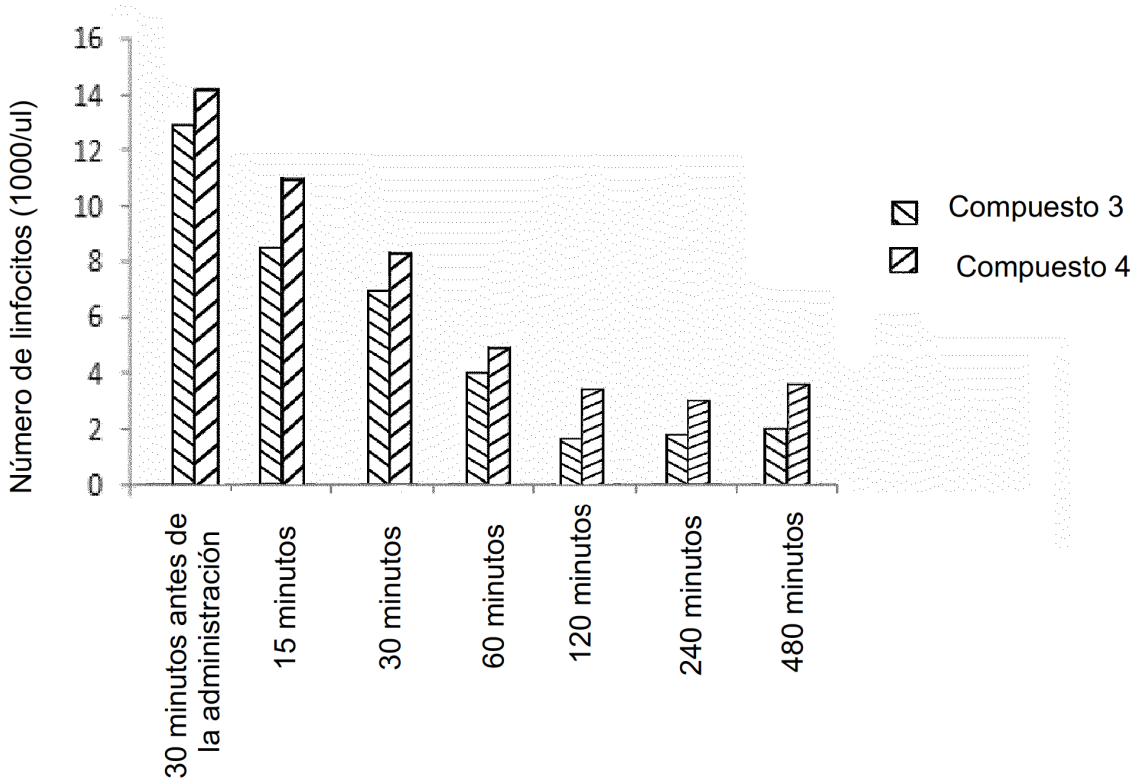

Número de linfocitos (1000/ul)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
30 minutos antes de la administración
15 minutos
30 minutos
60 minutos
120 minutos
240 minutos
480 minutos
Compuesto 3
Compuesto 4

Fig. 4

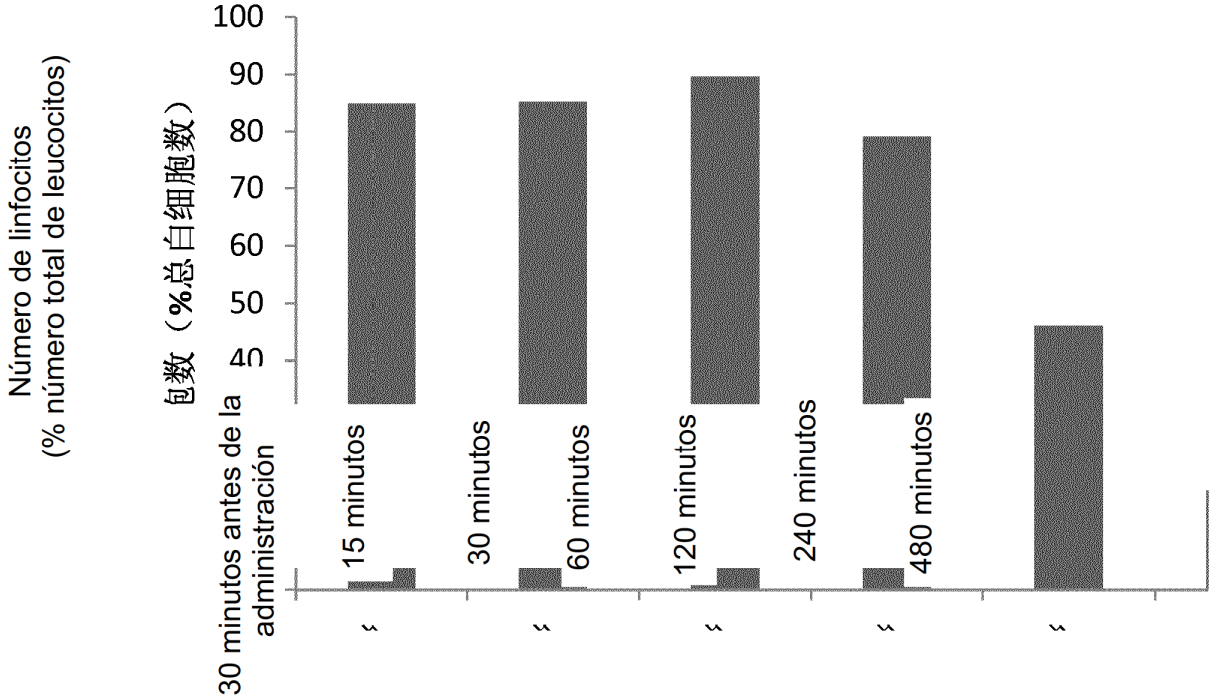

Número de linfocitos
(% número total de leucocitos)
包数（%总白细胞数）
100
90
80
70
60
50
40
30 minutos antes de la administración
15 minutos
30 minutos
60 minutos
120 minutos
240 minutos
480 minutos

Fig. 5

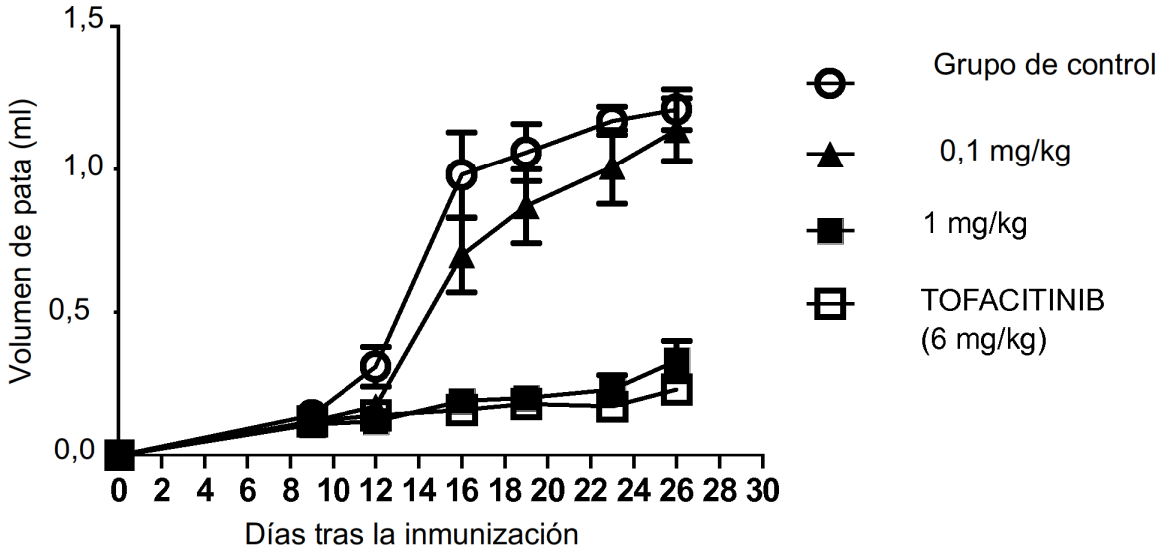

Volumen de pata (ml)
1,5
1,0
0,5
0,0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
Días tras la inmunización
Grupo de control
0,1 mg/kg
1 mg/kg
TOFACITINIB
(6 mg/kg)

Fig. 6

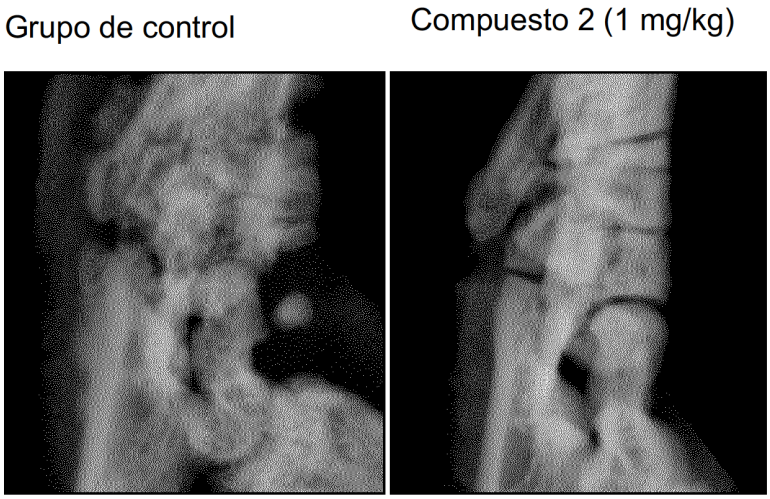

Grupo de control
Compuesto 2 (1 mg/kg)

Fig. 7

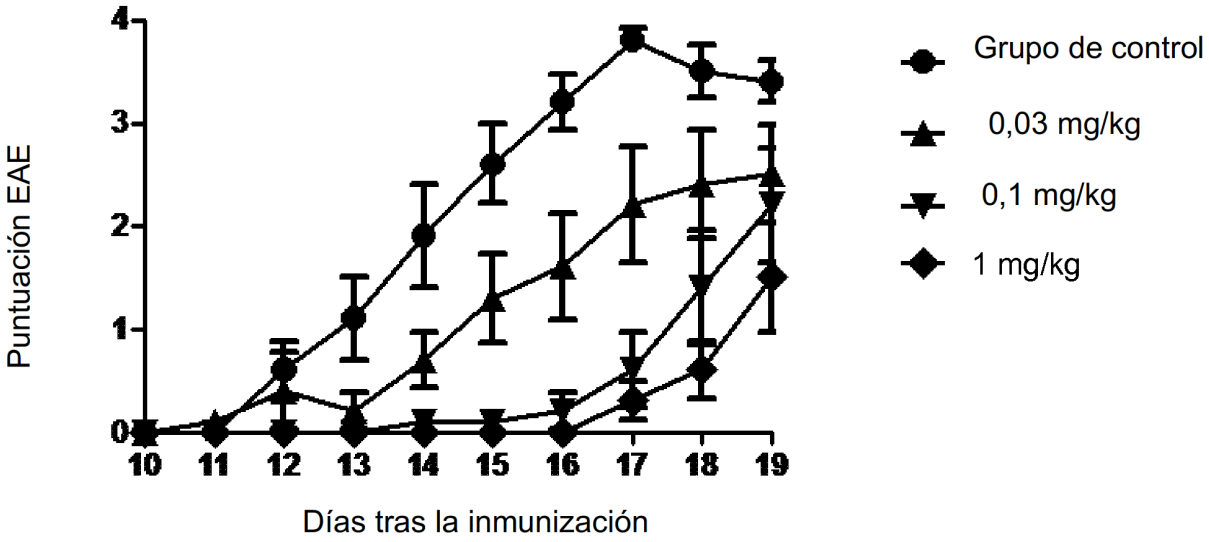

Puntuación EAE
0
1
2
3
4
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
Días tras la inmunización
Grupo de control
0,03 mg/kg
0,1 mg/kg
1 mg/kg

Fig. 8A

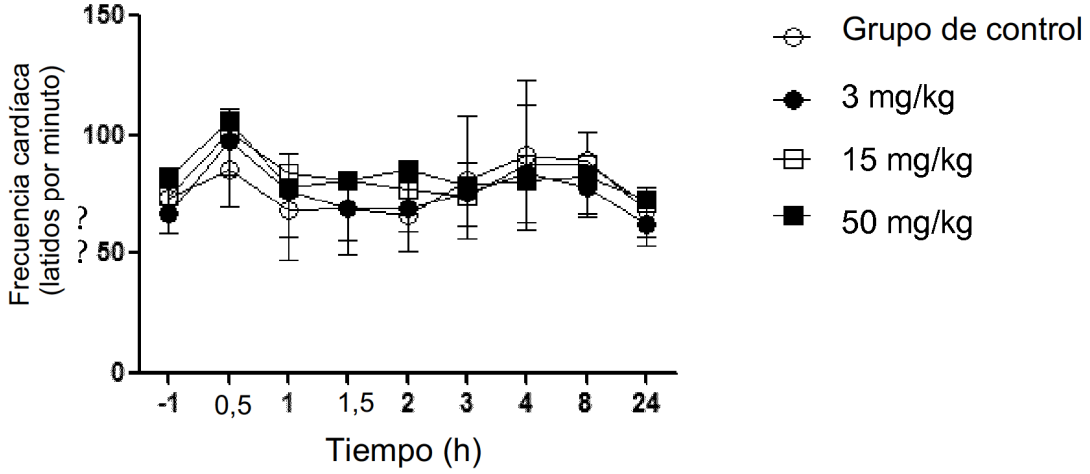


Fig. 8B

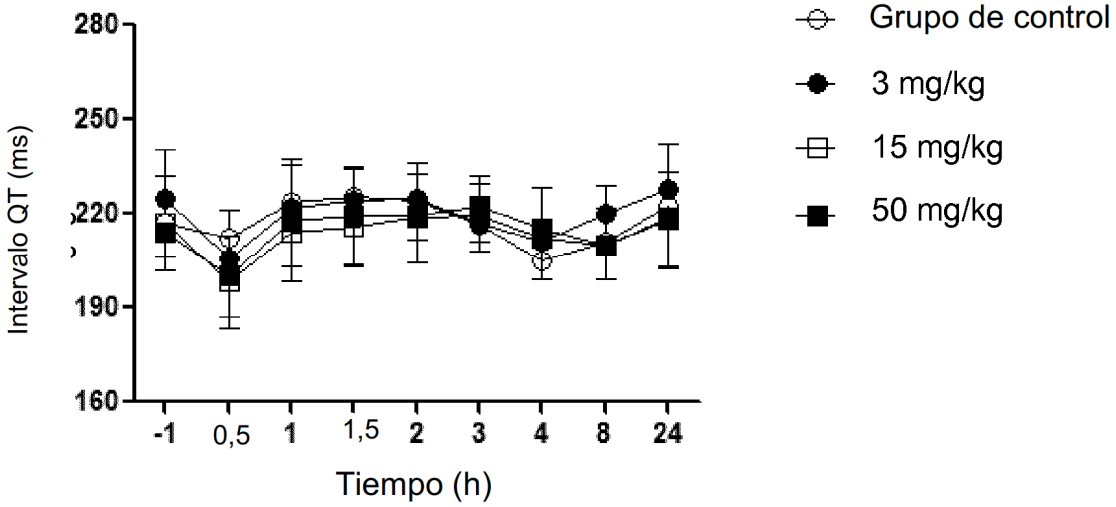
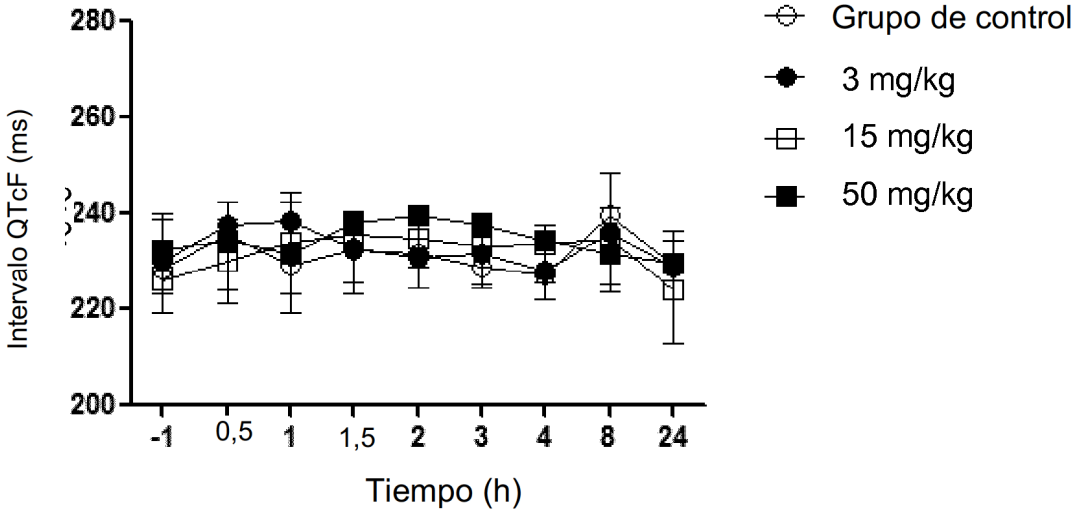



Fig. 8C