

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia Expediente No. NC2017/0004530

Asunto: Solicitud de patente para: 2-AMINO-3,5-DIFLUORO-6-METIL-6-FENIL-3,4,5,6-TETRAHIDROPIRIDINAS EN CALIDAD DE INHIBIDORES DE BACE1

Solicitante: H. LUNDBECK A/S

Fecha de solicitud: 05 de mayo de 2017

RESPUESTA A EXAMEN PRELIMINAR

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 6975, notificado por fijación en lista el 15 de mayo de 2017.

I. MODIFICACIONES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

Con el fin de atender las observaciones realizadas por el Examinador de manera preliminar al examen de patentabilidad, aporto un Capítulo Reivindicatorio modificado, conformado por 13 reivindicaciones, del cual se han eliminado las Reivindicaciones 14 a 17.. Esta modificación se ajusta al Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000, ya que no constituye una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Código Postal 110221 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 42 A No. 1 - 25 - Torre 4 - Oficina 303 - Código Postal 050021 - Tel: (57-4) 520 4760 - COLOMBIA
BARRANQUILLA - Calle 64 No. 50-22 - Código Postal 080002 - Barrio El Prado - Tel. (57-5) 3 51 64 40 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

II. EN CUANTO A LA CLARIDAD

Respecto a la observación en relación con la claridad y concisión del Capítulo Reivindicatorio, me permito respetuosamente mencionar que, de acuerdo al Manual de la Comunidad Andina, el examen de forma consiste en la verificación de cumplimiento de requisitos de la solicitud, en donde *“no se analizan la claridad ni concisión de las reivindicaciones. Basta con que el examinador de forma reconozca algo que parezca un capítulo reivindicatorio (...)”*.¹ En el presente caso, teniendo en cuenta que no hay arte previo citado y que la solicitud se encuentra en un examen preliminar, no existe ningún requerimiento legal que obligue al solicitante a limitar la materia reclamada. Por lo tanto, el solicitante no se ve obligado a responder la objeción en cuestión en esta etapa de examen de la solicitud y se abstiene de realizar modificaciones en respuesta a dicha objeción.

III. EN CUANTO AL CAPÍTULO DESCRIPTIVO

Con el fin de atender las observaciones realizadas por el Examinador de manera preliminar al examen de patentabilidad, aporto un Capítulo Descriptivo que contiene las tablas con los datos legibles. Esta modificación se ajusta al Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000, ya que no constituye una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

IV. EN CUANTO A LA INCLUSIÓN DE REIVINDICACIONES DE USO

En respuesta a la objeción del Examinador, respecto a que el Capítulo Reivindicatorio incluye usos y métodos de tratamiento, se han eliminado las Reivindicaciones 14 a 17 del Capítulo Reivindicatorio, como se mencionó anteriormente. Con base en lo anterior, considero que el Capítulo Reivindicatorio modificado adjunto cumple con todos los requisitos de patentabilidad, ajustándose así a los lineamientos del Artículo 20 de la Decisión 486.

¹ Oficina Internacional de la OMPI, *Manual para el Examen de Solicitudes de Patente de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina* (Quito, Ecuador, 2004). Capítulo II, Sección 5, p. 26.

**V. EN CUANTO AL PAGO DE TASA ADICIONAL POR EL NÚMERO DE
REIVINDICACIONES**

Presento junto con este escrito el comprobante de pago en línea de tasa adicional para el estudio de 3 reivindicaciones adicionales.

VI. PETICIÓN

Teniendo en cuenta que la presente solicitud cumple con los requisitos de los Artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de 2000, y considerando que se ha dado respuesta a cada una de las observaciones de la Dirección de Nuevas Creaciones con respecto a otros aspectos que tienen que ver con la patentabilidad de la invención, solicito a su Despacho continuar con el trámite administrativo correspondiente.

VII. ANEXOS

1. Capítulo Reivindicatorio modificado conformado por 13 reivindicaciones.
2. Capítulo Descriptivo con las tablas legibles.
3. Comprobante de pago de tasa por 3 reivindicaciones adicionales.

Señor Director,

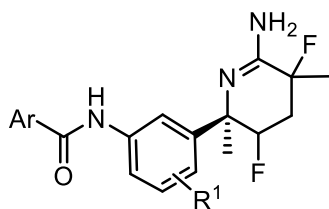
ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Un compuesto de fórmula I



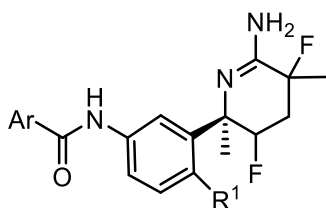
Fórmula I

donde Ar se selecciona a partir del grupo constituido por fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo y donde el Ar está sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno, CN, alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆; y

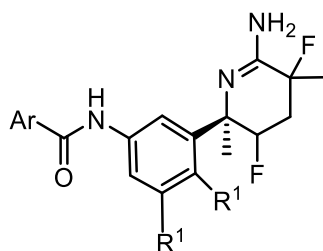
R¹ es uno o más de hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

2. Un compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el compuesto es de fórmula Ia o Ib



Fórmula Ia



Fórmula Ib

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

3. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 o 2, donde R¹ es F o H.
4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en donde Ar está opcionalmente sustituido con uno o más de F, Cl, Br, CN, alquilo C₁-C₃, fluoroalquilo C₁-C₃ o alcoxi C₁-C₃.

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en donde Ar es fenilo opcionalmente sustituido.
6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en donde Ar es piridilo opcionalmente sustituido.
7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde Ar es pirazinilo sustituido opcionalmente.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en donde Ar es imidazolilo opcionalmente sustituido.
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en donde Ar es pirazolilo opcionalmente sustituido.
10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, donde Ar es oxazolilo sustituido opcionalmente.
11. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, donde Ar es tiazolilo sustituido opcionalmente.
12. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona a partir del grupo constituido por:

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-(difluorometil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-clorobenzamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)pirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*R*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-bromopicolinamida

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

13. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-12 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un portador farmacéuticamente aceptable.

CAPÍTULO DESCRIPTIVO

5 **2-AMINO-3,5-DIFLUORO-6-METIL-6-FENIL-3,4,5,6-TETRAHIDROPIRIDINAS EN** **CALIDAD DE INHIBIDORES DE BACE1**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos que actúan como inhibidores de
10 BACE1. Algunos aspectos independientes de la invención se refieren a composiciones
farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y usos de los compuestos para tratar
trastornos neurodegenerativos y cognitivos.

TÉCNICA ANTERIOR

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por déficits en múltiples áreas
15 de la cognición que no se pueden explicar por el envejecimiento normal, un deterioro
notable de las funciones y una ausencia del síndrome confusional. Además, suelen
observarse síntomas neuropsiquiátricos y signos neurológicos focales. La demencia se
clasifica además según su etiología. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más
común de demencia, seguida de la demencia mixta por combinación de EA, la demencia
20 vascular, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la demencia frontotemporal. Se
considera que los depósitos β -amiloides y los ovillos neurofibrilares constituyen
caracterizaciones patológicas principales asociadas con la EA, que se caracteriza por la
pérdida de memoria, cognición, razonamiento, juicio y orientación. También se ven
afectadas, según avanza la enfermedad, las capacidades motoras, sensoriales y lingüísticas
25 hasta que ocurre un deterioro global de múltiples funciones cognitivas. Los depósitos de
 β -amiloide son predominantemente un agregado del péptido A β el cual a su vez es un
producto de la proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en
inglés) como parte de la ruta β -amiloidogénica. El péptido A β resulta de la escisión de APP
en el extremo C por parte de una o más γ -secretasas y en el extremo N por parte de β -
30 secretasa 1 (BACE1) también conocida como aspartil proteasa 2. La actividad de BACE1 se

correlaciona directamente con la generación de péptido A β a partir de APP.

Los estudios indican que la inhibición de BACE1 impide la producción del péptido A β . Además, BACE1 se co-localiza con sus sustrato APP en Golgi y compartimientos endocíticos (Willem M, et al. Semin.Cell Dev. Biol, 2009, 20, 175-182). Estudios de

5 inmunodeficiencia en ratones han demostrado la ausencia de la formación de péptido amiloide mientras que los animales están sanos y son fértiles . La ablación genética de BACE1 en ratones que sobre-expresan APP ha demostrado la ausencia de la formación de placas y la inversión de déficits cognitivos . Los niveles de BACE1 son elevados en los cerebros de pacientes de AD esporádicos .

10 Estos hallazgos convergentes indican que la inhibición de BACE1 puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de la AD, así como también de trastornos para los cuales es beneficiosa una reducción de los depósitos de A β .

AstraZeneca anunció el descubrimiento de AZD3839, un potente candidato clínico inhibidor de BACE1 para el tratamiento de AD en octubre de 2012. El esfuerzo que

15 condujo al descubrimiento de AZD3839 se describió adicionalmente en . La publicación de Ginman describe los inconvenientes que hubo que superar con relación al descubrimiento e identificación de AZD3839. Estos inconvenientes se relacionaron con la deficiente penetración en la barrera hematoencefálica y la salida mediada por la glicoproteína P de los compuestos, lo que resultó en una falta de exposición del cerebro.

20 El manuscrito de Ginman planteó la hipótesis de que las diferencias en la exposición del cerebro se deberían en gran medida a las estructuras nucleares y se proporcionaron datos sobre la Relación Actividad Estructura en los que se indicaron las propiedades in vitro de los compuestos presentados en cuatro tablas según los subtipos nucleares. En la tabla 4 se describe una serie de compuestos que contienen amidina que

25 se consideraron interesantes desde una perspectiva de la actividad. Sin embargo, los datos sugieren que el núcleo que contiene amidina no exhibió un perfil de permeabilidad de la barrera hematoencefálica favorable.

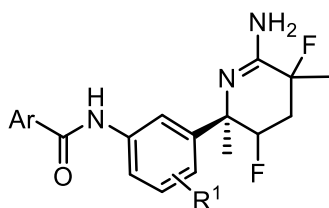
Investigadores de Hoffmann-La Roche y Siena Biotech también informaron sobre

el descubrimiento de compuestos que contienen amidina . Se descubrió que estos compuestos (compuestos 17 y 18 en el documento) no tienen ningún efecto in vivo (falta de reducción de Aβ40 en el cerebro en ratones no modificados).

En contraste con los hallazgos de Ginman, et al. y Woltering, T. J., et al., los inventores han descubierto una serie de compuestos de amidina que penetran en el cerebro. Por lo tanto, la presente invención se refiere a compuestos novedosos que tienen actividad inhibidora de BACE1, a su preparación, a su uso médico y a medicamentos que los comprenden.

SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención proporcionar compuestos que inhiban BACE1. Por consiguiente, la presente invención se refiere a compuestos de Fórmula I



Fórmula I

donde Ar se selecciona a partir del grupo constituido por fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo y donde el Ar está sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno, CN, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆; y

R¹ es uno o más de hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃;

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para uso en terapia.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste en la fabricación de un medicamento para

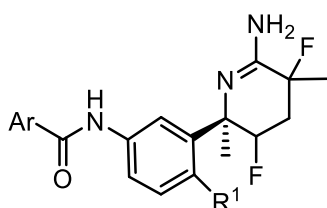
el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo.

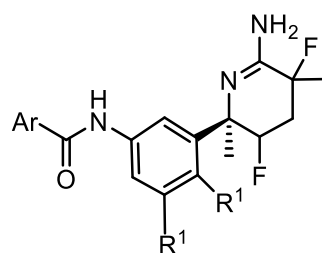
- 5 En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar un trastorno neurodegenerativo o cognitivo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este a un paciente que lo necesite.

A continuación se proporcionan realizaciones adicionales de la invención:

- 10 En una realización, el compuesto de la presente invención es de fórmula Ia o Ib



Fórmula Ia



Fórmula Ib

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

En una realización, R^1 es F o H, especialmente F.

En una realización, el compuesto de la presente invención es de fórmula Ia y R^1 es F.

- 15 En una realización, Ar está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de F, Cl, Br, CN, alquilo C_1-C_3 , fluoroalquilo C_1-C_3 o alcoxi C_1-C_3 .

En una realización, Ar es fenilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es piridilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es pirimidilo sustituido opcionalmente.

- 20 En una realización, Ar es pirazinilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es imidazolilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es pirazolilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es tiazolilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es oxazolilo sustituido opcionalmente.

En una realización, Ar es isoxazolilo sustituido opcionalmente.

En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazina-2-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida,
- N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-1-(difluorometil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida,

5 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-
fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-4-clorobenzamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

10 fluorofenil)-5-cianopicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-

4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

15 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-
fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)pirazina-2-carboxamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-

20 4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*R*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida,

N-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

fluorofenil)-5-bromopicolinamida

25 o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

Una realización separada se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la lista anterior y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otra realización se dirige a un método de tratar un trastorno neurodegenerativo

o cognitivo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la lista anterior a un paciente en necesidad del mismo.

Otra realización más, se refiere a un uso de un compuesto de la lista anterior en la elaboración de un medicamento para tratar un trastorno neurodegenerativo o
5 cognitivo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de la lista anterior para uso en terapia.

Aún otra realización de la invención se dirige a un compuesto de la lista anterior para uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que compuestos de Fórmula I son inhibidores de BACE1 y, como tales, son útiles para el tratamiento de trastornos relacionados. Determinados aspectos de la invención se explican en mayor detalle más adelante, pero esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de
15 todas las diferentes maneras en las que se puede implementar la invención, o todas las características que pueden añadirse a la presente invención. Así pues, la siguiente memoria descriptiva pretende ilustrar algunas realizaciones de la invención y no especificar exhaustivamente todos los cambios, combinaciones y variaciones de estas.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión “alquilo C₁-C₆” se refiere a un
20 hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono inclusive. Los ejemplos de alquilo C₁-C₆ incluyen, sin carácter limitante, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 2-metil-1-propilo, n-pentilo y n-hexilo. De manera similar, el término “alquilo C₁-C₃” se refiere a un hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificado que tiene de uno a tres átomos de carbono
25 inclusive. Ejemplos de C₁-C₃ incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo y n-propilo.

Del mismo modo, la expresión “alcoxi C₁-C₆” se refiere a un grupo alcoxi saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono, inclusive, con la valencia abierta en el oxígeno. Los ejemplos de alcoxi C₁-C₆ incluyen, sin carácter

limitante, metoxi, etoxi, n-butoxi, t-butoxi y n-hexiloxi. El “alcoxi C₁-C₆” está sustituido opcionalmente con uno o más átomos de flúor.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión “fluoroalquilo C₁-C₆” se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a seis átomos de carbono, inclusive, sustituidos con uno o más átomos de flúor. Los ejemplos de fluoroalquilo C₁-C₆ incluyen, sin carácter limitante, trifluorometilo, pentafluoroetilo, 1-fluoroetilo, monofluorometilo, difluorometilo, 1,2-difluoroetilo y 3,4 difluorohexilo. De manera similar, la expresión “fluoroalquilo C₁-C₃” se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a tres átomos de carbono, inclusive, sustituidos con uno o más átomos de flúor por átomo de carbono.

El término “halógeno” se refiere a fluoro, cloro, bromo y yodo.

El término “alqueno C₂-C₆” se refiere a un grupo alqueno ramificado o no ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono y un doble enlace, que incluye, pero no se limita a etenilo, propenilo y butenilo.

El término “alquino C₂-C₆” se refiere a un grupo alquino ramificado o no ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono y un triple enlace, que incluye, pero no se limita a etinilo, propinilo y butinilo.

Se pretende que la expresión “cantidad eficaz”, tal como se utiliza en la presente, cuando se aplica a un compuesto de la invención, denote una cantidad suficiente para provocar un efecto biológico deseado. Se pretende que la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, cuando se aplica a un compuesto de la invención, denote una cantidad del compuesto que sea suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, anular, ralentizar o retrasar el avance de un estado del trastorno o enfermedad o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, el método de la presente invención proporciona la administración de combinaciones de compuestos. En tales casos, la “cantidad eficaz” es la cantidad del compuesto en dicha combinación suficiente para provocar el efecto biológico pretendido.

El término “tratamiento” o “tratando”, tal como se utiliza en esta memoria,

significa mejorar o revertir el progreso o la gravedad de una enfermedad o trastorno, o mejorar o revertir uno o más síntomas o efectos secundarios de dicha enfermedad o trastorno. “Tratamiento” o “tratando”, tal como se utiliza en esta memoria, significa también inhibir o bloquear tal como retardar, detener, restringir, impedir u obstruir el progreso de un sistema, afección o estado de una enfermedad o trastorno. A los efectos de esta invención, los términos “tratamiento” o “tratar” se refieren, además, a una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, en donde los “resultados clínicos beneficiosos o deseados” incluyen, sin carácter limitante, el alivio de un síntoma, disminución del alcance de un trastorno o enfermedad, estado de la enfermedad o trastorno estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de un estado de la enfermedad o trastorno, mejoría o paliación de un estado de la enfermedad o trastorno y remisión de una enfermedad o trastorno, ya sea parcial o total.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los compuestos de Fórmula I son inhibidores de BACE1 y, como tales, son útiles para el tratamiento de trastornos en los cuales las características patológicas comprenden depósitos de β -amiloide y ovillos neurofibrilares, tales como los trastornos neurodegenerativos o cognitivos.

Los compuestos de la presente invención, tal como se ha discutido anteriormente, se espera que sean útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer debido a sus efectos sobre los depósitos de β -amiloide y ovillos neurofibrilares. Esto incluye la enfermedad de Alzheimer familiar donde los pacientes portan mutaciones en genes específicos íntimamente relacionados con la producción del péptido A β . Sin embargo, es importante señalar que agregados de péptido A β no se limitan a la enfermedad de Alzheimer familiar, sino que son de manera similar una importante característica patofisiológica de la enfermedad de Alzheimer esporádica más común.

También se cree que los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer, es decir, etapas patológicas donde los cambios biológicos y estructurales han comenzado pero las

manifestaciones clínicas de la enfermedad aún no se han vuelto evidentes o todavía no se han desarrollado completamente. De hecho, la etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer puede comenzar años antes de que se manifieste cualquier síntoma clínico de la enfermedad. La etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer incluye la enfermedad de Alzheimer prodrómica, la enfermedad de Alzheimer preclínica y el deterioro cognitivo leve. Aunque el deterioro cognitivo leve podrá no estar relacionado con la enfermedad de Alzheimer, a menudo es una etapa de transición a la enfermedad de Alzheimer o está debida a la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer preclínica y la prodrómica son etapas asintomáticas y, normalmente, se diagnostican por la presencia de biomarcadores relacionados con la enfermedad de Alzheimer. En este contexto, se cree que los compuestos de la presente invención son útiles para ralentizar el avance de la etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer, tal como del deterioro cognitivo leve a la enfermedad de Alzheimer. También se cree que los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la pérdida de memoria, déficits de atención y demencia asociados con la enfermedad de Alzheimer.

Otras enfermedades, además del progreso de la enfermedad de Alzheimer, se caracterizan por los depósitos de β -amiloide y ovillos neurofibrilares. Aquí se incluye, p. ej., la trisomía 21 también conocida como síndrome de Down. Los pacientes que padecen síndrome de Down tienen un cromosoma 21 extra el cual contiene el gen para la proteína precursora del amiloide (APP). El cromosoma 21 extra conduce a una sobre-expresión de APP, lo cual conduce a niveles incrementados de péptido A β , que finalmente provoca el riesgo acusadamente incrementado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer vista en pacientes del síndrome de Down . La angiopatía amiloide cerebral se caracteriza también por depósitos β -amiloides y ovillos neurofibrilares en vasos sanguíneos del sistema nervioso central y, como tal, se espera que sea tratable con compuestos de la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad seleccionada entre enfermedad de Alzheimer (familiar o esporádica),

enfermedad de Alzheimer preclínica, enfermedad de Alzheimer prodrómica, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down y angiopatía amiloidea cerebral, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este a un paciente que lo necesite.

5 La presente invención proporciona además un método para inhibir BACE1 en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10 La presente invención también proporciona un método para inhibir la escisión mediada por la β -secretasa de la proteína precursora del amiloide que comprende administrar a un paciente que necesite tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

15 En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de la enfermedad de Alzheimer (familiar o esporádica), enfermedad de Alzheimer pre-clínica, enfermedad de Alzheimer prodromal, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down o angiopatía amiloide cerebral.

20 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para la elaboración de un medicamento para la inhibición de BACE1. La presente invención proporciona además el uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para la elaboración de un medicamento para la inhibición de la producción o acumulación del péptido A β .

25 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer (familiar o esporádica), enfermedad de Alzheimer preclínica, enfermedad de Alzheimer

prodrómica, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down o angiopatía amiloidea cerebral.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para su uso en un método para inhibir BACE1 o en un método para inhibir la producción o acumulación del péptido A β .

5 En una realización adicional, la invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para cualquiera de los tratamientos y usos anteriores.

En una realización, el mamífero es un ser humano.

En una realización, el paciente es un paciente humano.

La presente invención también comprende sales de los presentes compuestos,
10 normalmente, sales farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como también de ácidos orgánicos.

Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen el ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, sulfámico, nítrico y similares.
15 Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácido fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico, itacónico, láctico, metanosulfónico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetileno-salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico,
20 aspártico, esteárico, palmítico, etilendiaminotetraacético (EDTA), ácidos glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenposulfónico, p-toluenosulfónico, ácido teofilina-acético, así como las 8-haloteofilinas (por ejemplo, 8-bromoteofilina y similares). Ejemplos adicionales de sales de adición de ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables listadas en .

25 Además, los compuestos de esta invención pueden existir en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares.

Los compuestos de la presente invención podrán contener uno o más centros asimétricos y se pretende que cualesquiera isómeros ópticos (es decir, enantiómeros o

diastereómeros), ya sean isómeros ópticos separados, puros o parcialmente purificados y cualesquiera mezclas de estos, incluidas las mezclas racémicas, es decir, una mezcla de estereoisómeros, se incluyan en el alcance de la invención.

En este contexto, se sobreentenderá que, cuando se especifique la forma enantiomérica, entonces el compuesto estará presente en exceso enantiomérico, p. ej., esencialmente en una forma pura. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un compuesto de la invención que tiene un exceso enantiomérico de al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 96%,

Las formas racémicas se podrán resolver para obtener los enantiómeros ópticos utilizando métodos conocidos, por ejemplo, mediante la separación de las sales diastereoméricas de estos con un ácido ópticamente activo y liberando el compuesto amínico ópticamente activo por tratamiento con una base. La separación de tales sales diastereoméricas puede lograrse, p. ej., mediante cristalización fraccional. Los ácidos ópticamente activos, adecuados para este fin pueden incluir, pero no se limitan a ácidos D- o L- tartárico, mandélico o canfosulfónico. Otro método para la resolución de racematos en los antípodas ópticos se basa en cromatografía en una matriz ópticamente activa. Los compuestos de la presente invención también podrán resolverse mediante la formación y separación cromatográfica de derivados diastereoméricos a partir de reactivos derivatizantes quirales, tales como reactivos de alquilación o acilación quirales, con una escisión del auxiliar quiral. Cualquiera de los métodos anteriores podrá aplicarse para resolver los enantiómeros ópticos de los compuestos de la invención per se o para resolver los enantiómeros ópticos de intermedios sintéticos, los cuales pueden convertirse después mediante métodos descritos en la presente en productos finales resueltos ópticamente que son los compuestos de la invención.

Se podrán utilizar otros métodos para la resolución de isómeros ópticos, conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen los descritos por J. Jaques, A. Collet y S. Wilen en "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Nueva York, 1981. Compuestos ópticamente activos también se pueden preparar a

partir de materiales de partida ópticamente activos.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos específicos divulgados en la Sección experimental y un portador farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención se podrán administrar solos o combinados con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, ya sea en dosis individuales o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en .

Composiciones farmacéuticas para la administración oral incluyen formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, comprimidos, grageas, píldoras, pastillas, polvos y gránulos. En caso apropiado, las composiciones se pueden preparar con revestimientos tales como revestimientos entéricos, o se pueden formular con el fin de proporcionar una liberación controlada del ingrediente activo tal como una liberación sostenida o prolongada de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires. Composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones inyectables, acuosas y no acuosas, estériles, así como polvos estériles a ser reconstituídos en soluciones o dispersiones inyectables estériles antes del uso. Otras formas de administración adecuadas incluyen, sin carácter limitante, supositorios, aerosoles, pomadas, cremas, geles, inhaladores, parches dérmicos e implantes.

Las dosis orales típicas varían entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día.

Los compuestos de esta invención se utilizan generalmente como la base libre o como una sal farmacéuticamente aceptable de estos. Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula I se prepara, p. ej., de una manera convencional tratando una solución o suspensión de una base libre de Fórmula I con un equivalente molar de un ácido farmacéuticamente aceptable. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos e inorgánicos adecuados se describen arriba.

Portadores farmacéuticamente adecuados incluyen diluyentes o cargas sólidos inertes, soluciones acuosas estériles y diversos disolventes orgánicos. Ejemplos de portadores sólidos incluyen lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrina, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y alquil inferior-ésteres de celulosa. Los ejemplos de portadores líquidos incluyen, sin carácter limitante, almíbar, aceite de maní, aceite de oliva, fosfolípidos, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, polioxietileno y agua. De manera similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera. Las composiciones farmacéuticas formadas al combinar los compuestos de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste y un portador farmacéuticamente aceptable se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación adecuadas para las vías de administración descritas. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria por métodos conocidos en la técnica de farmacia.

Si se utiliza un portador sólido para la administración oral, el preparado se podrá comprimir, introducir en una cápsula de gelatina dura en forma de polvo o pellet, o podrá estar en forma de una pastilla o gragea. La cantidad de portador sólido variará considerablemente pero estará comprendida entre aproximadamente 25 mg y aproximadamente 1 g por unidad de dosificación. Si se utiliza un portador líquido, el preparado puede estar en forma de un jarabe, emulsión, cápsula de gelatina blanda o líquido inyectable estéril tal como una suspensión o solución acuosa o no acuosa.

Los compuestos de la presente invención, como se demuestra en los ejemplo, inhibidores potentes de BACE1, y son capaces de disminuir el nivel del péptido A β en el cerebro y plasma de rata y, por tanto, se cree que dichos compuesto son útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y cognitivos cuyas características

5 patológicas comprenden depósitos de A β y ovillos neurofibrilares, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Puede ser beneficioso combinar un compuesto de la presente invención con otro tratamiento convencional útil en el tratamiento de dicha enfermedad, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.

Las proteínas tau son abundantes en las neuronas. Las proteínas tau son solubles

10 muy lábiles en la fosforilación y se unen a tubulina, proporcionando la regulación y modulación del ensamblaje de tubulina, es decir, finalmente la estructura microtubular y la estabilidad. Las proteínas tau solamente se pueden asociar con la tubulina en el principal estado desfosforilado, y la fosforilación/defosforilación actúa como un interruptor que controla la asociación de tubulina. La tau fosforilada constituye una parte

15 importante de los ovillos neurofibrilares, que son uno de los principales rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer. La denominada hipótesis tau sugiere el direccionamiento de estos ovillos patológicos, un componente principal de lo que es la proteína tau fosforilada, como paradigma de tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. En particular, las inmunoterapias, tanto activas como pasivas, se han sugerido

20 como formas de dirigirse a los ovillos neurofibrilares de tau. En la inmunoterapia activa, un antígeno patógeno dentro del paciente y el sistema inmunitario innato provoca una respuesta inmunitaria. Esta desencadena la maduración de los linfocitos B generando anticuerpos de alta afinidad contra el antígeno administrado. En una inmunoterapia pasiva, el desencadenamiento del sistema inmunitario innato se evita infundiendo un

25 anticuerpo específico contra el antígeno. Se ha sugerido que el sistema inherente de eliminación elimina entonces el ligando unido a anticuerpo. Existe una evidencia sustancial de la eficacia de la proteína tau fosforilada dirigida a la inmunoterapia tanto activa como pasiva como un tratamiento de la enfermedad de Alzheimer 7(4, supl) .

En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra tau, a un paciente que lo necesita. Dicho compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra tau puede ser un anticuerpo dirigido contra la proteína tau fosforilada. Dicho compuesto útil en la inmunoterapia contra tau activa puede ser un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la proteína tau, el cual, tras la inyección en un paciente, provoca la generación de un anticuerpo contra la proteína tau anti-fosforilada en dicho paciente. La administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entra la administración de ambos componentes.

En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra tau en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra tau para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra tau y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro paradigma para tratar un trastorno neurodegenerativo y cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, es dirigirse a los péptidos A β . Se ha sugerido que esto se puede conseguir mediante inmunoterapia tanto activa como pasiva dirigida a

péptidos A β En combinación con los compuestos de la presente invención, estos intentaría dirigirse al mismo mecanismo patológico mediante dos rutas diferentes. Los anticuerpos anti-A β (tanto inyectados directamente en el paciente como generados en el paciente como resultados de la inmunoterapia activa) eliminan los depósitos de A β del cerebro, mientras que la acumulación adicional del péptido A β se bloquea o se reduce mediante los compuestos de la presente invención.

En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra el péptido A β , a un paciente que lo necesita. Dicho compuesto útil en la inmunoterapia pasiva contra el péptido A β puede ser un anticuerpo contra el péptido A β , tal como gantenerumab, solanezumab, aducanumab o crenezumab. Dicho compuesto útil en la inmunoterapia activa contra el péptido A β puede ser un fragmento de la secuencia de aminoácidos del péptido A β que, tras su inyección a un paciente, desencadena anticuerpos contra el péptido A β en dicho paciente. La administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entre la administración de ambos componentes.

En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra el péptido A β en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra el péptido A β para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un compuesto útil en la inmunoterapia activa o pasiva contra el péptido A β y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 El antagonista del receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato) memantina y los inhibidores de la acetilcolina esterasa donepezilo, rivastigmina y galantamina son fármacos autorizados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer,
10 donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un antagonista del receptor NMDA o un inhibidor de la acetilcolina esterasa, a un paciente que lo necesita. La administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entra la
15 administración de ambos componentes.

En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un antagonista del receptor NMDA o un inhibidor de la acetilcolina esterasa en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad
20 de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un antagonista del receptor NMDA o un inhibidor de la acetilcolina esterasa para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

25 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un antagonista del receptor NMDA o un inhibidor de la acetilcolina esterasa y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las convulsiones o la actividad epileptiforme también están asociadas con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo las etapas iniciales de la enfermedad de Alzheimer, y el tratamiento de dicha actividad epiléptica, cuyo objetivo es normalizar la actividad del hipocampo, puede formar parte de un paradigma de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los antiepilépticos útiles incluyen inhibidores del receptor NMDA y moduladores de los canales de iones, tales como topiramato, levetiracetam y lamotrigine.

En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un antiepiléptico, a un paciente que lo necesita. La administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entra la administración de ambos componentes.

En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un antiepiléptico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y antiepiléptico para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un antiepiléptico y un portador farmacéuticamente aceptable.

Existe cada vez más evidencias que sugieren que la inflamación tiene un papel causativo en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, y que dicha neuroinflamación no es un sistema pasivo activado por los depósitos de β -amiloide de reciente aparición o los ovillos neurofibrilares, sino que también contribuye a la propia patogénesis. De ello se

deduce que fármacos anti-inflamatorios tales como NSAID (fármacos anti-inflamatorios no esteroides), inhibidores de TNF α tales como etanercept e inhibidores de y MAP quinasa p38 tales como VX-745 (5-(2,6-diclorofenil)-2-((2,4-difluorofenil)tio)-6H-pirimido[1,6-b]piridazin-6-ona) pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

5 En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un fármaco anti-inflamatorio, a un paciente que lo necesita. La
10 administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entra la administración de ambos componentes.

 En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un fármaco anti-inflamatorio en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o
15 cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

 En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un fármaco anti-inflamatorio para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

20 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un fármaco anti-inflamatorio y un portador farmacéuticamente aceptable.

 Además, se ha demostrado eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de los inhibidores de la agregación de la proteína tau, tales como TRX-0237, también conocido como Metilene Blue, e SSRI (inhibidor selectivo de la recaptación de
25 serotonina), tal como citalopram .

 En una realización, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer,

donde el método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dos componentes (1) un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y (2) un inhibidor de la agregación de la proteína tau o SSRI, a un paciente que lo necesita. La administración de acuerdo con esta realización de la invención puede ser simultánea, o puede existir un lapso de tiempo entre la administración de ambos componentes.

En una realización, la invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de la agregación de la proteína tau o SSRI en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un inhibidor de la agregación de la proteína tau o SSRI para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo o cognitivo, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente de este y un inhibidor de la agregación de la proteína tau o SSRI y un portador farmacéuticamente aceptable.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Los compuestos de la presente invención de la fórmula general I, en donde R¹ y Ar son como se definen arriba se pueden preparar por los métodos esbozados en los siguientes esquemas de reacción 1-7 y en los ejemplos. En los métodos descritos, es posible hacer uso de variantes o modificaciones que por sí mismas son conocidas para los químicos expertos en la técnica o que podrían ser evidentes para la persona de experiencia ordinaria en esta técnica. Además, será obvio para el experto en la técnica que existen otros métodos para preparar los compuestos de la invención teniendo en cuenta los siguientes esquemas de reacción y ejemplos.

Por ejemplo, el Esquema 2 describe el uso de grupos protectores selectivos

durante la síntesis de los compuestos de la invención. Un experto en la técnica sería capaz de seleccionar el grupo protector apropiado para una reacción particular. Además de ello, puede ser necesario incorporar estrategias de protección y desprotección para sustituyentes tales como grupos amino, amido, ceto e hidroxilo en los métodos de síntesis descritos más adelante para sintetizar los compuestos de Fórmula I. Los métodos para la protección y desprotección de tales grupos son muy conocidos en la técnica y podrán encontrarse en

Para los compuestos que pueden existir como una mezcla o equilibrio entre dos o más tautómeros, solamente se representa un tautómero en los esquemas, aunque puede que no sea el tautómero más estable. Para los compuestos que pueden existir en formas isoméricas enantioméricas, estereoisoméricas o geométricas, se especifica su configuración geométrica; en caso contrario, la estructura representa una mezcla de estereoisómeros.

Los datos analíticos de LC-MS se obtuvieron utilizando los siguientes métodos.

Método A:

El LC-MS se realizó en Waters Acquity UPLC-MS que consiste en Waters Acquity que incluye administrador de columnas, administrador de disolventes binario, organizador de muestras, detector PDA (que funciona a 254 nm), detector ELS y SQ-MS equipado con una fuente APPI que funciona en modo de ion positivo.

Condiciones de LC: la columna fue Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m; 2.1x150mm que funcionaba a 60 °C con 0.6 ml/min de un gradiente binario constituido por agua + 0.05% de ácido trifluoroacético (A) y acetonitrilo + 5% de agua + 0.03% de ácido trifluoroacético (B). Gradiente 0.00 min: 10% de B; 3.00 min: 99.9% de B; 3.01 min: 10% de B; 3.60 min: 10% de B. Tiempo total de ejecución: 3.60 min.

Método B:

El LC-MS se llevó a cabo en un UPLC-MS Waters Acquity constituido por un Waters Acquity que incluye un administrador de columnas, administrador de disolventes binario, organizador de muestras, detector PDA (que funciona a 254 nm), detector ELS y

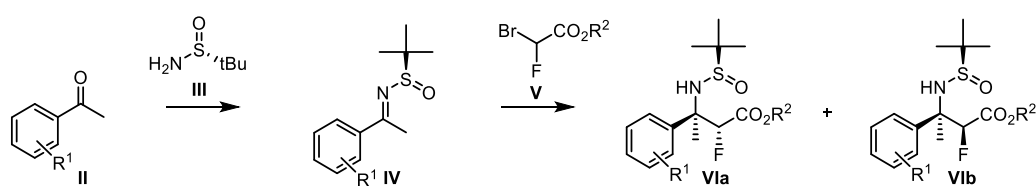
TQ-MS equipado con una fuente APPI que funciona en modo de ion positivo.

Condiciones de LC: la columna fue Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m; 2.1x50mm que funcionaba a 60 $^{\circ}$ C con 1.2 ml/min de un gradiente binario constituido por agua + 0.05% de ácido trifluoroacético (A) y acetonitrilo + 5% de agua + 0.05% de ácido trifluoroacético (B). Gradiente 0.00 min: 10% de B; 1.00 min: 100% de B; 1.01 min: 10% de B; 1.15 min: 10% de B. Tiempo total de ejecución: 1.15 min.

Los espectros de ^1H RMN se registraron a 600 MHz en un instrumento Bruker Avance AV-III-600 o a 400 MHz en un instrumento Bruker Avance AV-III-400 o un instrumento Varian 400. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en valores de ppm relativos. Se utilizan las siguientes abreviaturas para la multiplicidad de las señales de RMN: s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuádruplete, dd = doble doblete, ddd = doble doblete doble, dt = doble triplete, a = ancho y m = multiplete.

Compuestos de las fórmulas generales VIa y VIb se pueden preparar tal como se muestra en el Esquema 1.

Esquema 1



en que R^1 es como se define bajo la fórmula I y R^2 es un grupo alquilo tal como metilo o etilo.

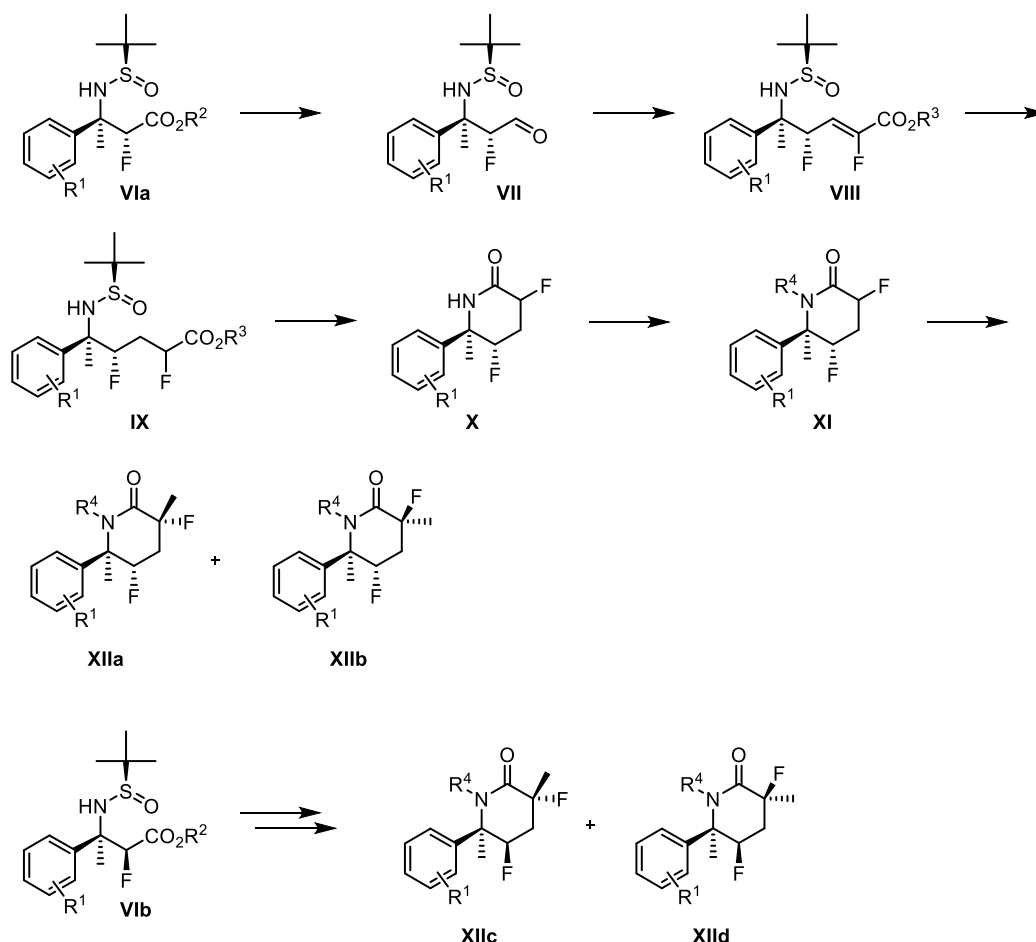
Compuestos de la fórmula general IV (Esquema 1) se pueden preparar haciendo reaccionar compuestos de fórmula II con una sulfonamida tal como III en presencia de un ácido de Lewis/agente de secado tal como tetraetóxido de titanio. El tratamiento de compuestos de la fórmula IV con compuestos de la fórmula general V tales como bromofluoroacetato de etilo en presencia de polvo de o en presencia de dietil-zinc y cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) da compuestos de las fórmulas generales VIa y VIb

que se pueden separar mediante cromatografía.

Compuestos de las fórmulas generales XIIa y XIIb se pueden preparar tal como se muestra en el Esquema 2.

5

Esquema 2



en que R² y R³ son grupos alquilo tales como metilo o etilo y R⁴ es un grupo protector tal como *tert*-butoxicarbonilo.

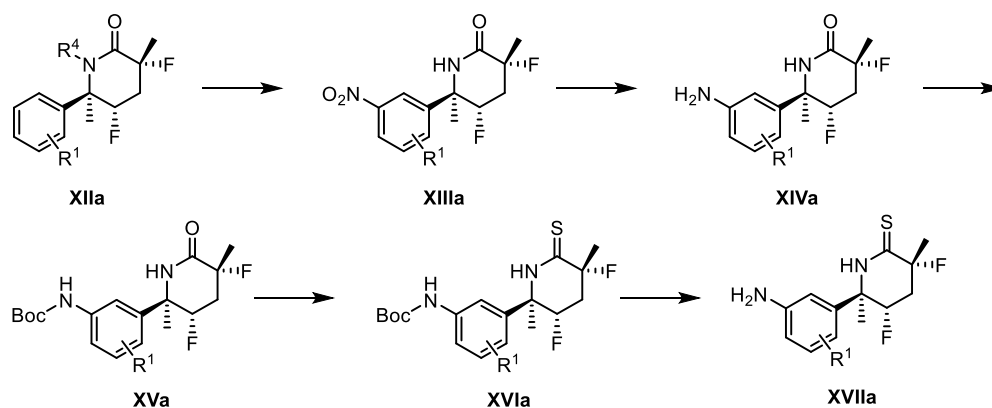
10

Compuestos de fórmula VII (Esquema 2) se pueden preparar mediante tratamiento de compuestos de fórmula VIa con un agente reductor tal como hidruro de diisobutilaluminio. En algunos casos, el compuesto VII puede estar en equilibrio con la forma hidrato. El tratamiento de compuestos de la fórmula general VII con condiciones tales como 2-(dietoxifosforil)-2-fluoroacetato de etilo en presencia de cloruro de litio y una base tal como *N,N*-diisopropiletilamina da compuestos de la fórmula general VIII en la forma *E* o *Z* o una mezcla de las mismas. Compuestos de la fórmula general IX se obtienen

por hidrogenación de compuestos de fórmula general VIII en presencia de un catalizador tal como paladio sobre carbono. Compuestos de la fórmula general X se obtienen mediante tratamiento de compuestos de la fórmula general IX con un ácido tal como ácido clorhídrico en metanol, seguido de calentamiento del compuesto intermedio en un
 5 disolvente de elevado punto de ebullición tal como tolueno o xilenos y en presencia de una base tal como trietilamina. Compuestos de la fórmula general XI se obtienen mediante tratamiento de compuestos de la fórmula general X con dicarbonato de di-*terc.*-butilo en presencia de una cantidad catalítica de *N,N*-dimetil-4-amino-piridina. Compuestos de la fórmula general XIIa y XIIb se obtienen mediante tratamiento de
 10 compuestos de la fórmula general XI con una base tal como hexametildisilazida de litio, seguido de alquilación con un haluro de alquilo. Los mismos procedimientos descritos anteriormente se pueden utilizar también para la síntesis de compuestos de las fórmulas generales XIIc y XIId partiendo de VIb.

Como un ejemplo y en donde R¹ es fluoro en la posición 2 del anillo de fenilo o en
 15 donde el anillo de fenilo está sustituido con dos flúoros en las posiciones 2 y 3, el compuesto de la fórmula general XVIIa se puede preparar tal como se muestra en el Esquema 3.

Esquema 3

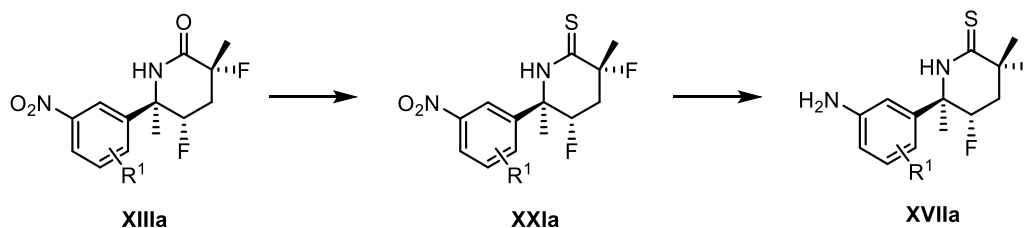


en que R⁴ es un grupo protector tal como *terc.*-butoxicarbonilo.

Compuestos de la fórmula general XIIIa se obtienen tratando los compuestos de

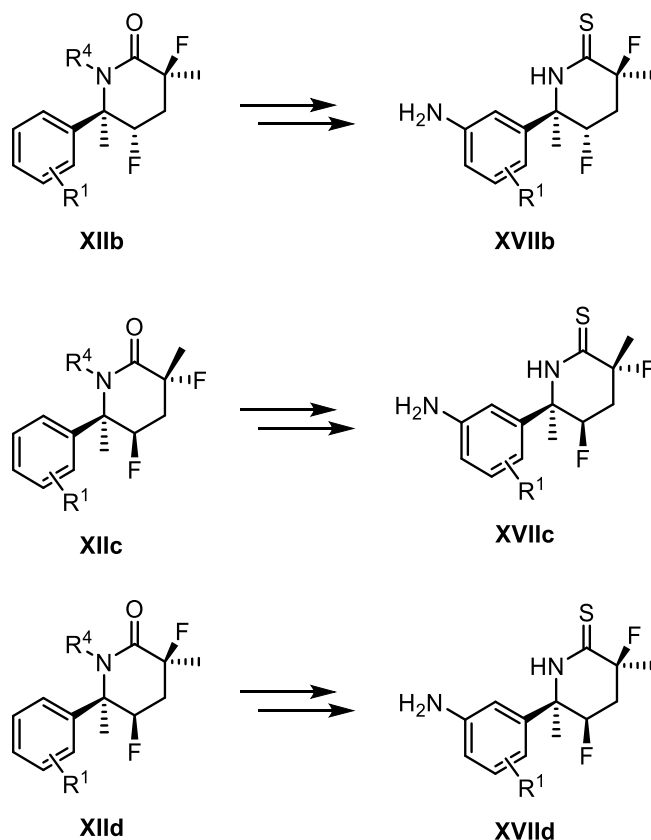
la fórmula general XIIa con ácido nítrico. Esto desprotegerá el resto amida a la vez que nitrará el anillo de benceno en la posición indicada. La reducción del grupo nitro de compuestos de la fórmula general XIIIa, seguido de la desprotección del resto anilina formado da compuestos de la fórmula general XVa. El tratamiento de compuestos de la fórmula general XVa con un reactivo tal como el reactivo de Lawesson (2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-disulfuro) da compuestos de la fórmula general XVIa. La desprotección de XVIa bajo condiciones tales como ácido trifluoroacético en diclorometano da el compuesto XVIIa. Alternativamente, se puede cambiar el orden de las reacciones y los compuestos de la fórmula general XIIIa se pueden hacer reaccionar con un reactivo tal como el reactivo de Lawesson para dar compuestos de la fórmula general XXIa que, después de la reducción del grupo nitro, también da compuestos de la fórmula general XVIIa (Esquema 4).

Esquema 4



Como un ejemplo y en donde R¹ es fluoro en la posición orto del anillo de fenilo o en donde el anillo de fenilo está sustituido con dos fluoros en las posiciones 2 y 3, el compuesto de la fórmula general XVIIb (Esquema 5) puede prepararse mediante los mismos procedimientos que los mostrados en los Esquemas 3 y 4, pero partiendo de compuesto de fórmula general XIIb. De igual manera, los mismos procedimientos se pueden utilizar para la síntesis de compuestos de las fórmulas generales XVIIc y XVIId partiendo de XIIc y XIId, respectivamente.

Esquema 5



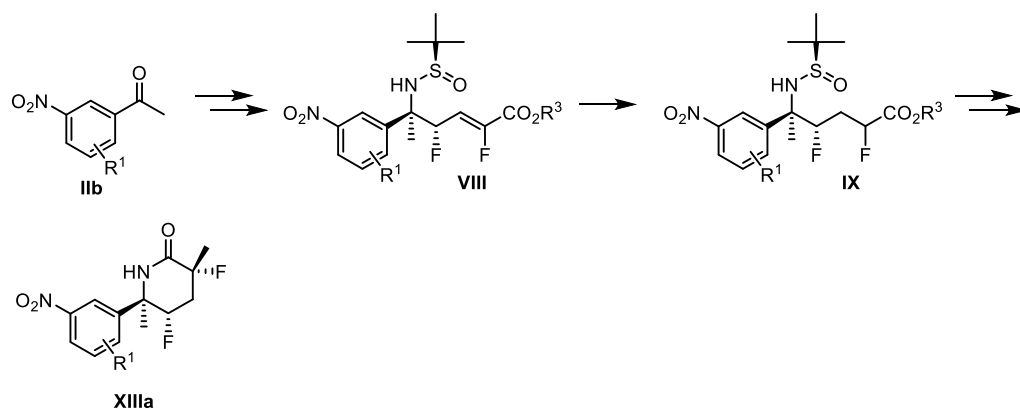
en que R^4 es un grupo protector tal como *terc.*-butoxicarbonilo.

Compuestos de las fórmulas generales XIIIa se pueden preparar también tal como

5 se muestra en el Esquema 6. Partiendo de acetofenonas sustituidas con nitro de fórmula general IIb, compuestos de la fórmula general VIII se pueden preparar tal como se describe en los Esquemas 1 y 2. Compuestos de la fórmula general IX se pueden obtener mediante reducción selectiva del resto olefina de compuestos de la fórmula general VIII. Compuestos de la fórmula general XIIIa se pueden preparar tal como se describe para los

10 compuestos de fórmula general XIIa en el Esquema 2. De igual manera, compuestos de las fórmulas generales XIIb, XIIc y XIIId también se pueden preparar tal como se muestra en el Esquema 6, partiendo de acetofenonas sustituidas con nitro de fórmula general IIb.

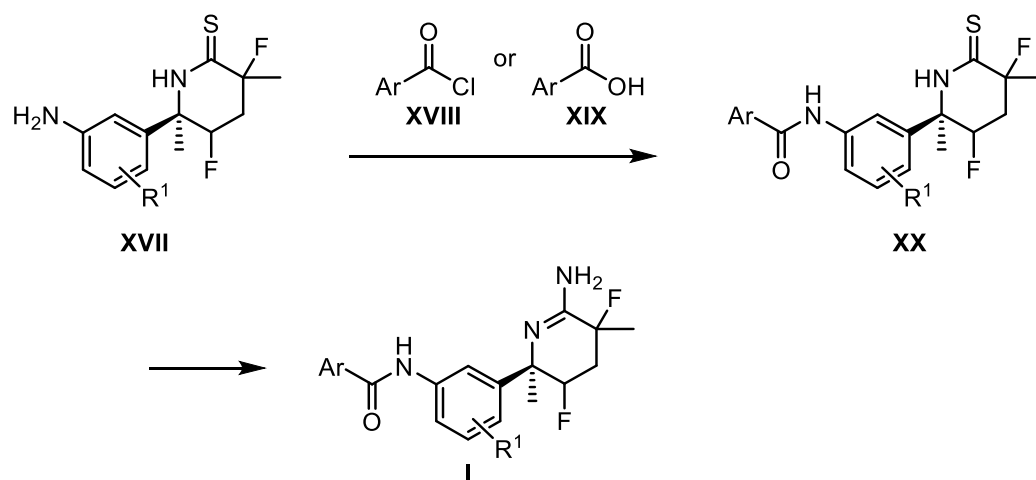
Esquema 6



donde R^1 es tal como se define en la fórmula I y R^3 es un grupo alquilo tal como metilo o etilo.

- 5 Los compuestos de fórmula general I podrán prepararse tal como se muestra en el Esquema 7.

Esquema 7

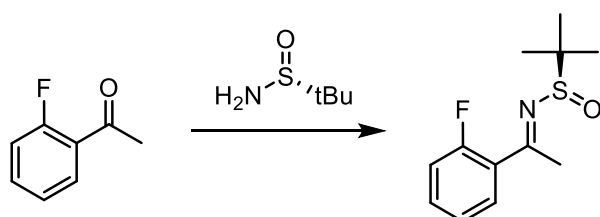


- 10 en que R^1 y Ar son como se definen bajo la fórmula I.

- Compuestos de la fórmula general XX (Esquema 7) se pueden preparar haciendo reaccionar compuestos de la fórmula general XVII con un cloruro de ácido carboxílico de fórmula general XVIII o mediante reacción con un ácido carboxílico de fórmula general XIX utilizando procedimientos conocidos por los químicos expertos en la técnica. El
- 15 tratamiento de compuestos de la fórmula general XX con amoníaco da compuestos de la fórmula general I. En algunos casos, la adición de un reactivo oxidante tal como hidroperóxido de *terc.*-butilo podría ser necesaria para facilitar la reacción.

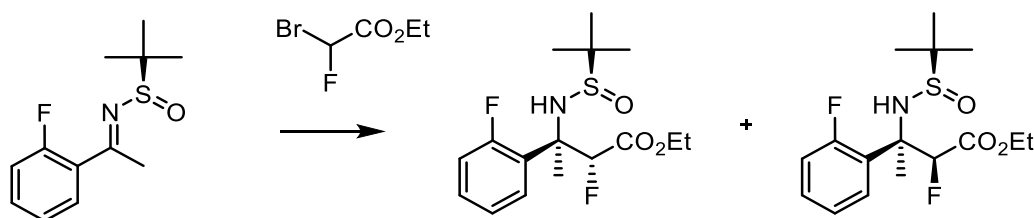
PREPARACIÓN DE COMPUESTOS INTERMEDIOS

COMPUESTO INTERMEDIO: (*R*)-*N*-[1-(2-fluorofenil)etilideno]-2-metil-propano-2-sulfinamida



5 A una disolución de 1-(2-fluorofenil)etanona (100 g, 723.9 mmol) y (*R*)-2-metilpropano-2-sulfinamida (105.28 g, 868.68 mmol) en THF (2.00 L) se añadió tetraetoxititanio (330.26 g, 1.45 mol). La solución se calentó hasta 80°C y se agitó durante 18 horas. La reacción se enfrió bruscamente mediante agua (500 mL) y luego se extrajo con acetato de etilo (500 mL, 4 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera (500 mL). Se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El
 10 residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (altura de la columna: 250 mm, diámetro: 100 mm, gel de sílice de malla 100-200, éter de petróleo/acetato de etilo=10/1, 5/1) para dar (*R*)-*N*-[1-(2-fluorofenil)etilideno]-2-metil-propano-2-sulfinamida (150 g, rendimiento de 86%).

15 COMPUESTOS INTERMEDIOS: (2*R*,3*R*)-3-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo y (2*S*,3*R*)-3-[[(*R*)-*terc.*-butisulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo

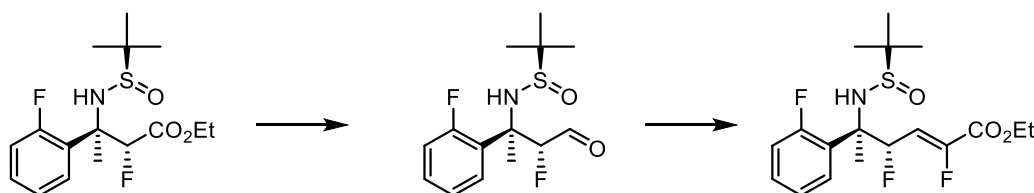


A una suspensión de (*R*)-*N*-[1-(2-fluorofenil)etilideno]-2-metil-propano-2-sulfinamida (20. g, 82.9 mmol), 2-bromo-2-fluoro-acetato de etilo (30.66 g, 165.8 mmol) y Rh(PPh₃)₃Cl (2.30 g, 2.49 mmol) en THF anhidro (400 mL) se añadió Et₂Zn (1M en THF, 249 mL) gota a gota a 0°C a lo largo de un periodo de 10 minutos bajo argón, durante lo cual la
 20 temperatura se mantuvo por debajo de 5°C. La mezcla de reacción se calentó hasta 30°C y

se agitó a 30°C durante 18 horas. La reacción se enfrió bruscamente con agua (150 mL), se filtró y luego se extrajo con acetato de etilo (3 × 500 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (40 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea (éter de petróleo: acetato de etilo = 100:1 a 3:1) para dar (2*R*,3*R*)-3-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo (11.2 g, rendimiento de 39%) y una fracción impura que contiene (2*S*,3*R*)-3-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo. Después de purificación por HPLC preparativa de la última fracción, se aisló (2*S*,3*R*)-3-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo (0.8 g, rendimiento de 3%).

(2*R*,3*R*)-3-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-3-(2,3-difluorofenil)-2-fluorobutanoato de etilo se preparó de una manera similar partiendo de (*R*)-*N*-[1-(2,3-difluorofenil)etilideno]-2-metil-propano-2-sulfinamida.

COMPUESTO INTERMEDIO: (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hex-2-enoato de etilo



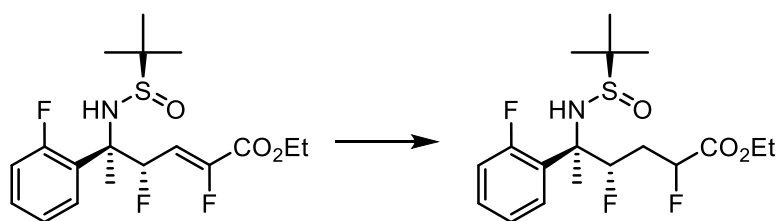
A una solución de (2*R*,3*R*)-3-[[(*R*)-*tert*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo (10.0 g, 28.8 mmol) en THF (200 mL) se añadió DIBAL-H (hidruro de diisobutilaluminio) (1M en THF, 143.9 mL) gota a gota a -78°C a lo largo de un periodo 30 minutos bajo N₂. La solución de reacción amarilla se agitó a -78°C durante 3.5 horas. La reacción se enfrió bruscamente con agua (200 mL), se filtró y se extrajo con acetato de etilo (200 mL, 4 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (200 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo* para dar el producto bruto (*R*)-*N*-[(2*R*,3*R*)-3-fluoro-2-(2-fluorofenil)-4-oxobutan-2-il]-2-metilpropano-2-sulfinamida (8.0 g, bruto). A una suspensión de 2-dietoxifosforil-2-fluoro-acetato de etilo (5.13 g, 21.2 mmol), DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) (1.18 g, 9.1

mmol) y LiCl (386 mg, 9.1 mmol) en acetonitrilo (150 mL) se añadió una solución de (*R*)-*N*-((2*R*,3*R*)-3-fluoro-2-(2-fluorofenil)-4-oxobutan-2-il)-2-metilpropano-2-sulfonamida (2.30 g, 7.58 mmol) en acetonitrilo (20 mL) gota a gota a 0°C a lo largo de un periodo de 10 minutos bajo N₂. La suspensión se calentó hasta 25°C y se agitó durante 18 horas. La reacción se concentró *in vacuo* y el residuo se extrajo con acetato de etilo (100 mL, 3 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (100 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 5:1, 1:1) para dar (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hex-2-enoato de etilo (3.44 g, 8.79 mmol, rendimiento de 49.8%).

(4*R*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hex-2-enoato de etilo se preparó de una manera similar, partiendo de (2*S*,3*R*)-3-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2-fluoro-3-(2-fluorofenil)butanoato de etilo

(4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2,3-difluorofenil)hex-2-enoato de etilo se preparó de una manera similar, partiendo de (2*R*,3*R*)-3-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-3-(2,3-difluorofenil)-2-fluorobutanoato de etilo.

COMPUESTO INTERMEDIO: (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo



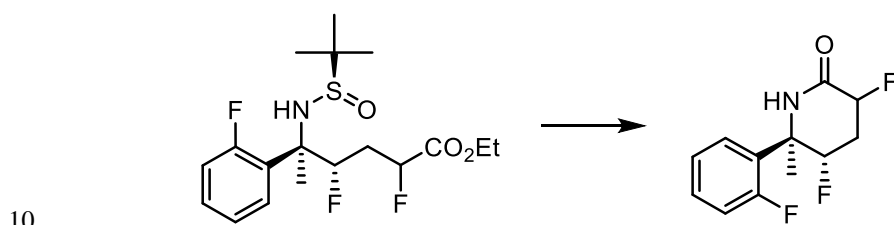
A una solución de (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hex-2-enoato de etilo (13.77 g, 35.18 mmol) en acetato de etilo (500 mL) se añadió Pd/C (al 10%, 2.00 g, húmedo). La suspensión negra se desgasificó en vacío y se purgó varias veces con H₂. La mezcla se agitó bajo H₂ (50 psi) a 30°C durante 18 horas. La suspensión se filtró y el filtrado se concentró para dar producto de (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*terc.*-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo (10.5 g, rendimiento

de 75.9%).

(4*R*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo se preparó de una manera similar, partiendo de (4*R*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hex-2-enoato de etilo

5 (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2,3-difluorofenil)hexanoato de etilo se preparó de una manera similar, partiendo de (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2,3-difluorofenil)hex-2-enoato de etilo.

COMPUESTO INTERMEDIO: 5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluorofenil)-6-metilpiperidin-2-ona



A una solución de (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo (10.50 g, 26.69 mmol) en MeOH (100 mL) se añadió HCl/MeOH (4 M, 50 mL) en una porción a 30°C bajo N₂. La solución incolora se agitó a 30°C durante 2 horas. La solución se concentró en vacío para dar (4*S*,5*S*)-5-amino-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo bruto (6.50 g, 21.35 mmol, rendimiento de 80%) que se disolvió en tolueno (100 mL) y se añadió trietilamina (2.19 g, 21.64 mmol). La solución incolora se agitó a 110°C durante 18 horas. La reacción se concentró *in vacuo*, el residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo = 3:1, 1:1) para dar (5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluorofenil)-6-metil-piperidin-2-ona (4.50 g, 17.6 mmol, rendimiento de 78.2%).

(5*R*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluorofenil)-6-metilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (4*R*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-(2-fluorofenil)hexanoato de etilo.

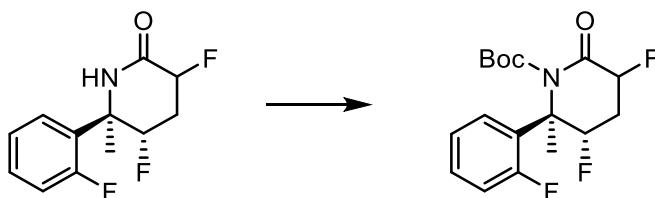
(5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2,3-difluorofenil)-6-metilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (4*S*,5*R*)-5-[[(*R*)-*tert*.-butilsulfinil]amino]-2,4-difluoro-5-

(2,3-difluorofenil)hexanoato

de etilo

COMPUESTO INTERMEDIO: (2*R*,3*S*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2-metil-6-oxo-

5 piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo



A una solución de 5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluorofenil)-6-metil-piperidin-2-ona

(4.50 g, 18.50 mmol) y dicarbonato de di-*terc.*-butilo (8.08 g, 37.0 mmol) en THF (100 mL)

se añadió *N,N*-dimetilpiridin-4-amina (113 mg, 925 µmol) en una porción a 25°C bajo N₂.

10 La solución incolora se agitó a 25°C durante 48 horas. La solución se enfrió bruscamente

con agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (100 mL, 3 veces). Las fases orgánicas

reunidas se lavaron con salmuera saturada (50 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se

filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de

resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo = 20:1, 5:1)

15 para dar (2*R*,3*S*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de

terc.-butilo (4.70 g, 13.0 mmol, rendimiento de 70.3%).

(2*R*,3*R*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de

terc.-butilo se preparó de una manera similar, partiendo de (5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-

fluorofenil)-6-metilpiperidin-2-ona.

20 (2*R*,3*S*)-3,5-difluoro-2-(2,3-difluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato

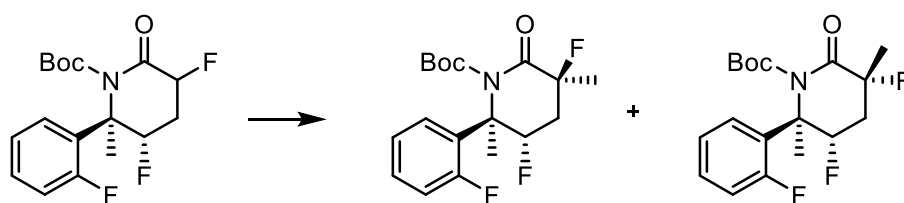
de *terc.*-butilo se preparó de una manera similar, partiendo de (5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2,3-

difluorofenil)-6-metilpiperidin-2-ona

COMPUESTOS INTERMEDIOS: (2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-

dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo y (2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2-(2-

25 fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo

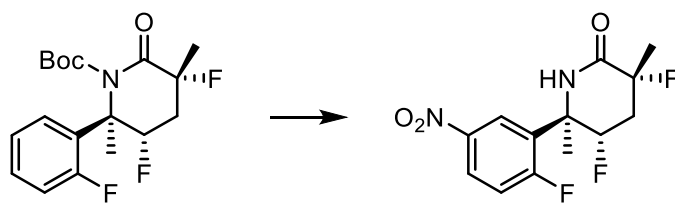


A una solución de (2*R*,3*S*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo (1.50 g, 4.37 mmol) en THF (30 mL) se añadió LiHMDS (bis(trimetilsilil)amida de litio) (1 M, 8.74 mL) gota a gota a -78°C a lo largo de un periodo de 10 minutos bajo N₂. La disolución se agitó a -78°C durante 1 hora y luego a la solución se añadió yodometano (3.10 g, 21.9 mmol). La solución de reacción se agitó a -78°C durante otros 45 minutos. Después se dejó que la suspensión se calentara hasta 25°C y se agitó durante 18 horas. La reacción se enfrió bruscamente lentamente mediante hielo y luego se extrajo con acetato de etilo (30 mL, 3 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (30 mL, dos veces), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo:acetato de etilo = 15:1, 10:1) para dar los productos (2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo (550 mg, 1.54 mmol, rendimiento de 35.2%) y (2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo (600 mg, 1.68 mmol, rendimiento de 38.4%).

(2*R*,3*R*,5*S*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo se preparó de una manera similar, partiendo de (2*R*,3*R*)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo

(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2-(2,3-difluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo y (2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2-(2,3-difluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo se prepararon de una manera similar, partiendo de (2*R*,3*S*)-3,5-difluoro-2-(2,3-difluorofenil)-2-metil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo.

COMPUESTO INTERMEDIO: (3*R*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitro-fenil)-3,6-dimetil-piperidin-2-ona



A (2R,3S,5R)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-

carboxilato de *terc.*-butilo (1.20 g, 3.36 mmol) en ácido trifluoroacético (5.69 mL, 73.9 mmol) se añadió H₂SO₄ (1.27 mL, 25.9 mmol) y luego a la solución se añadió HNO₃ (1.16 mL, 16.8 mmol), la solución se agitó a 0°C durante 30 min, después la solución se se agitó a 50°C durante 18 horas, la LCMS no mostró material de partida, la solución se vertió en hielo-agua (p/p =1/1) (50 mL) y se basificó a pH > 11 utilizando NaOH acuoso 5N. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL, 3 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (100 mL), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1, 2/1) para dar (3R,5S,6R)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitro-fenil)-3,6-dimetil-piperidin-2-ona (1.0 g, rendimiento de 99%).

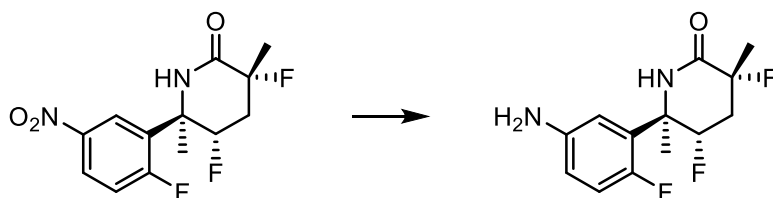
(3S,5S,6R)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (2R,3S,5S)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo.

(3S,5S,6R)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (2R,3S,5S)-3,5-difluoro-2-(2-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo.

(3R,5S,6R)-3,5-difluoro-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (2R,3S,5S)-3,5-difluoro-2-(2,3-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo.

(3S,5S,6R)-3,5-difluoro-6-(2,3-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (2R,3S,5S)-3,5-difluoro-2-(2,3-fluorofenil)-2,5-dimetil-6-oxo-piperidina-1-carboxilato de *terc.*-butilo.

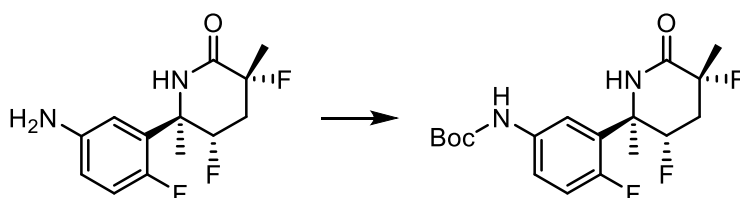
COMPUESTO INTERMEDIO: (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidin-2-ona



A una solución de (3*R*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitro-fenil)-3,6-dimetil-piperidin-2-ona (1.10 g, 3.64 mmol) en acetato de etilo (100 mL) se añadió Pd/C (al 10%, húmedo, 0.5 g) bajo N₂. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó con H₂ varias veces. La mezcla se agitó bajo H₂ (15 psi) a 25°C durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró para dar (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidin-2-ona (950 mg, 3.49 mmol, rendimiento de 96%).

(3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidin-2-ona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona.

COMPUESTO INTERMEDIO: *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-oxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo

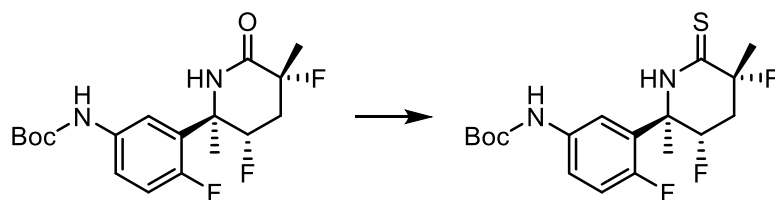


A una mezcla de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidin-2-ona (750 mg, 2.75 mmol) en NaHCO₃ acuoso (5 mL) y diclorometano (20 mL) se añadió dicarbonato de di-*terc.*-butilo (1.80 g, 8.26 mmol) en una porción a 25°C bajo N₂. La mezcla incolora se agitó a 25°C durante 18 horas. La mezcla se enfrió bruscamente con agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (50 mL, 3 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (50 mL, dos veces), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de

etilo = 10/1, 1/1) para dar *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-oxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo (850 mg, rendimiento de 83%).

N-[3-[(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-oxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidin-2-ona.

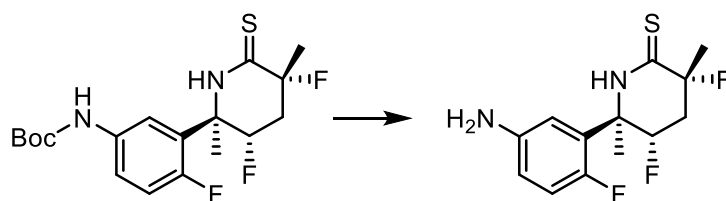
COMPUESTO INTERMEDIO: *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo



A una suspensión de *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-oxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo (250 mg, 671 μ mol) en tolueno (10 mL) se añadió reactivo de Lawesson (2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifosfetano-2,4-disulfuro) (149 mg, 369 μ mol) en una porción a 90°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 90°C durante 1 hora. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1, 1/1) para dar *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo (230 mg, rendimiento de 88%).

N-[3-[(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamate de *terc.*-butilo se preparó de una manera similar, partiendo de *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-oxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo.

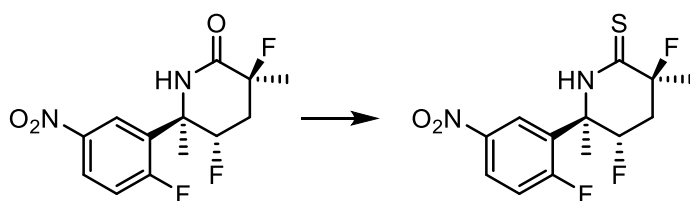
COMPUESTO INTERMEDIO: (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidin-2-ona



A una solución de *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*R*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo (500 mg, 1.29 mmol) en diclorometano (20 mL) se añadió HCl/MeOH (10 mL) en una porción a 25°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 25°C durante 18 horas. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en agua (10 mL), el pH de la solución se basificó a pH=7-8 utilizando solución acuosa saturada de NaHCO₃ y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (20 mL, 3 veces). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (20 mL, dos veces), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron en vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 10/1, 1/1) para dar (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona (318 mg, rendimiento de 85.5%).

(3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de *N*-[3-[(2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxo-2-piperidil]-4-fluoro-fenil]carbamato de *terc.*-butilo.

COMPUESTO INTERMEDIO: (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona



A una suspensión de (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona (4.50 g, 14.89 mmol) en tolueno (100 mL) se añadió reactivo de Lawesson (3.31 g, 8.19 mol) en una porción a 90°C bajo N₂. La mezcla se agitó a 90°C durante 2 horas. La mezcla se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo) para dar (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona (4.0 g, rendimiento de 84%).

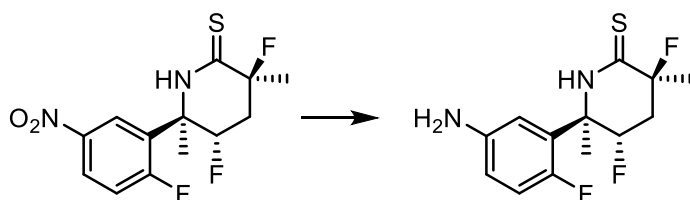
(3*S*,5*R*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*R*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-

nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidin-2-ona.

(3*S*,5*S*,6*R*)-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidin-2-ona.

5 (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidin-2-ona.

COMPUESTO INTERMEDIO: (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona



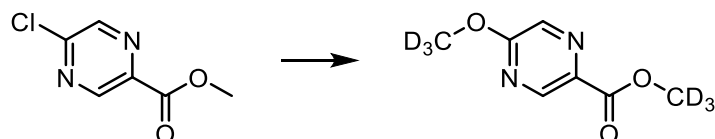
10

A una solución de (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona (4.50 g, 14.14 mmol) y NH₄Cl (3.78 g, 70.70 mmol) en etanol (80 mL) y agua (20 mL) se añadió polvo de hierro (3.95 g, 70.70 mmol) en una porción a 25°C bajo N₂. La suspensión negra se agitó a 25°C durante 18 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo (100 mL × 3). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera saturada (100 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía de resolución instantánea sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo) para dar (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidins-2-tiona (2.59 g, rendimiento de 61%). (3*S*,5*R*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*R*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2-fluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona.

(3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2,3-difluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*S*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona.

(3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2,3-difluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona se preparó de una manera similar, partiendo de (3*R*,5*S*,6*R*)-3,5-difluoro-6-(2,3-difluoro-5-nitrofenil)-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona.

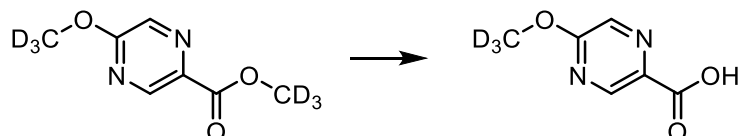
INTERMEDIO: 5-(metoxi-*d*₃)pirazin-2-carboxilato de metilo-*d*₃



5

Se añadió sodio (0.094 g, 4.10 mmol) en pequeñas porciones de metanol-*d*₄ (2.94 mL) y se agitó la mezcla de reacción hasta que todo el sodio hubo reaccionado. A continuación se añadió la solución a otra solución de 5-cloropirazin-2-carboxilato de metilo (0.6 g, 3.48 mmol) en metanol-*d*₄ (0.98 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo*. Se añadieron 2 mL de agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró *in vacuo* para dar metil-*d*₃-5-(metoxi-*d*₃)pirazina-2-carboxilato.

COMPUESTO INTERMEDIO: Ácido 5-(metoxi- *d*₃)pirazina-2-carboxílico



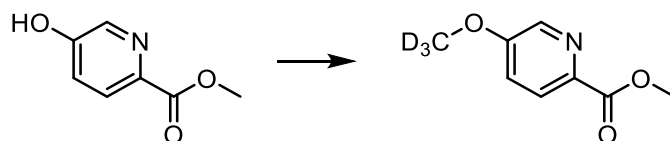
15

Metil-*d*₃-5-(metoxi-*d*₃)pirazina-2-carboxilato (424 mg, 2.43 mmol) se disolvió en agua (3 ml) y 1,4-dioxano (3 ml).

Se añadió hidróxido de litio (146 mg, 6.09 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó hasta aproximadamente 2 ml y se extrajo con dietil éter. La fase orgánica se extrajo con NaOH 1 M y las fases acuosas combinadas se acidificaron hasta pH 2 con HCl 6 N (ac). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y el compuesto sólido se recogió para dar ácido 5-(metoxi-*d*₃)pirazina-2-carboxílico.

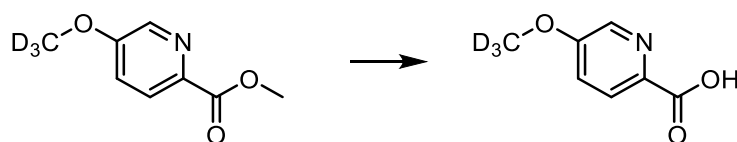
25

COMPUESTO INTERMEDIO: 5-(metoxi- d_3)picolinato de metilo



Se disolvió 5-hidroxipicolinato de metilo (2.88 g, 18.8 mmol) en dimetilformamida (108 mL) bajo argón. Se añadió carbonato de potasio (7.20 g, 52.1 mmol) y la suspensión naranja se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadió yodometano- d_3 (1.41 mL, 22.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas. Se añadió agua. La mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (heptano: acetato de etilo) para dar 5-(metoxi- d_3)picolinato de metilo.

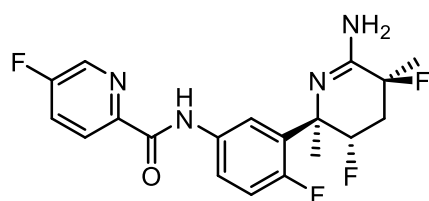
COMPUESTO INTERMEDIO: Ácido 5-(metoxi- d_3)picolínico



Se disolvió 5-(metoxi- d_3)picolinato de metilo (200 mg, 1.175 mmol) en agua (1.5 ml) y 1,4-dioxano (3 ml). Se añadió hidróxido de litio (70.4 mg, 2.94 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó hasta aproximadamente 2 ml y se extrajo con dietil éter. La fase orgánica se extrajo con NaOH 1 M y las fases acuosas combinadas se acidificaron hasta pH 2 con HCl 6 N (ac). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se formó un precipitado. El precipitado se recogió para dar ácido 5-(metoxi- d_3)picolínico.

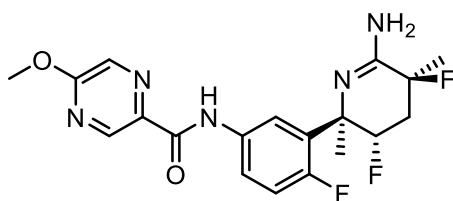
PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida (compuesto 1)



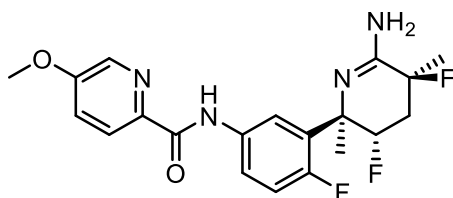
A una solución de ácido 5-fluoropicolínico (0.019 g, 0.14 mmol) en DMF (1 mL) se añadió HATU (3-oxido hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio) (0.046 g, 0.12 mmol) y la solución se agitó durante 5 minutos. Después se añadieron (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona (0.025 g, 0.092 mmol) y DIPEA (*N,N*-diisopropiletilamina) (0.08 mL, 0.46 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió NH₄Cl acuoso saturado y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en amoníaco 7M en metanol (2 mL). La mezcla se agitó a 65°C durante la noche, se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (heptano:acetato de etilo). El aceite obtenido se disolvió en acetato de etilo y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado/agua (1/1) cinco veces. La fase orgánica se concentró a presión reducida para proporcionar *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida (0.019 mmol, 21%). Los siguientes compuestos se prepararon de una manera similar al ejemplo 1:

Ejemplo 2 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida (compuesto 2)



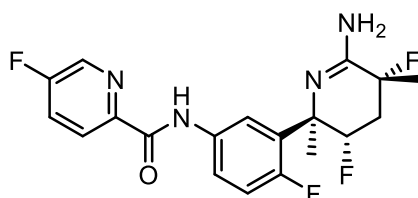
Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico.

Ejemplo 3 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida (compuesto 3)



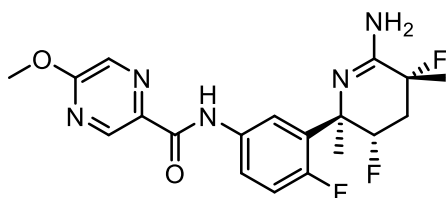
Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-metoxipicolínico.

Ejemplo 4 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida (compuesto 4)



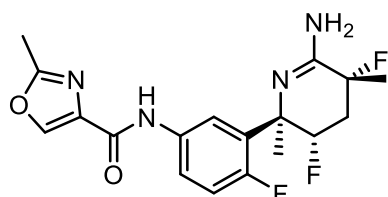
Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-fluoropicolínico.

Ejemplo 5 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazina-2-carboxamida (compuesto 5)



Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-metoxipirazina-2-carboxílico.

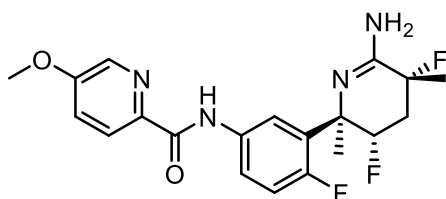
Ejemplo 6 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida (compuesto 6)



Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-

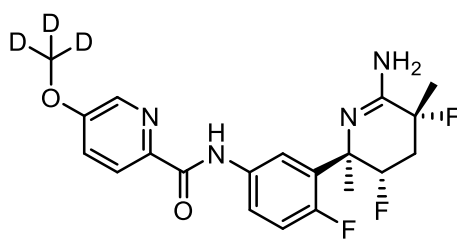
dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 2-metiloxazol-4-carboxílico.

Ejemplo 7 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida (compuesto 7)

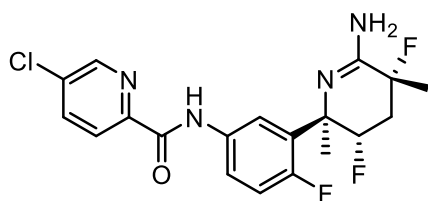


5 Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-metoxipicolínico.

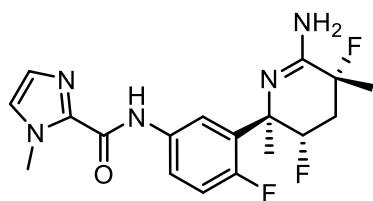
Ejemplo 8 *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-*d*₃)picolinamida (Compuesto 8)



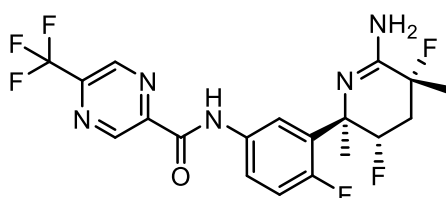
10 Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi-*d*₃)picolínico. **Ejemplo 9** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida (Compuesto 9)



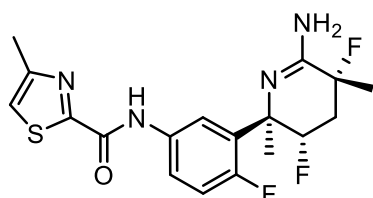
15 Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 4-clorobenzoico. **Ejemplo 10** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*R*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxamida (Compuesto 10)



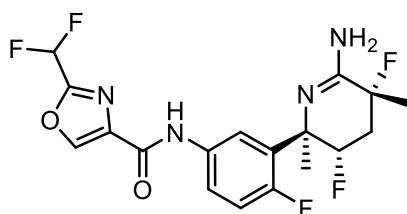
Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 1-metil-1H-imidazol-2-carboxílico. **Ejemplo 11** N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazina-2-carboxamida (Compuesto 11)



Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(trifluorometil)pirazina-2-carboxílico. **Ejemplo 12** N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida (Compuesto 12)

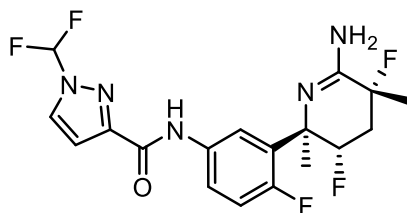


Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 4-metiltiazol-2-carboxílico. **Ejemplo 13** N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida (Compuesto 13)

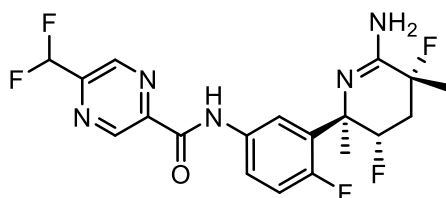


Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 1-(difluorometil)-1H-pirazol-3-carboxílico. **Ejemplo 14** N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-

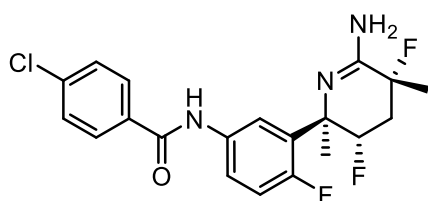
fluorofenil)-1-(difluorometil)-1H-pirazol-3-carboxamida(Compuesto 14)



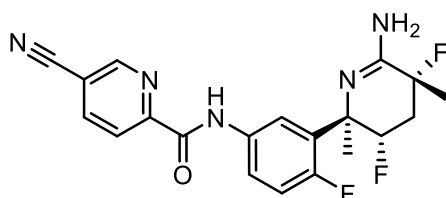
Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi- d_3)pirazina-2-carboxílico. **Ejemplo 15** N-(3-
5 ((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazina-2-carboxamida (Compuesto 15)



Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-ciano-3-metilpicolínico. **Ejemplo 16** N-(3-((2R,3S,5R)-6-
10 amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-clorobenzamida (Compuesto 16)

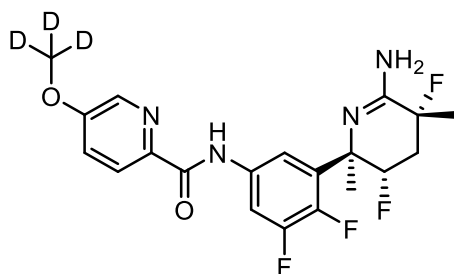


Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi- d_3)picolínico. **Ejemplo 17** N-(3-((2R,3S,5R)-6-
15 amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida (Compuesto 17)

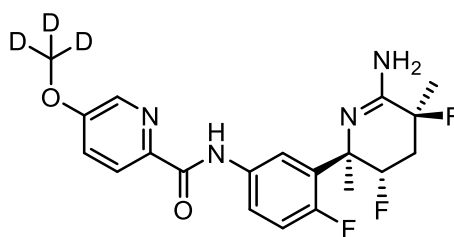


Preparada a partir de (3R,5S,6R)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-cianopicolínico. **Ejemplo 18** N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-

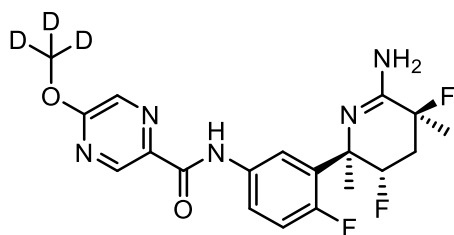
3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-
 d_3)picolinamida (Compuesto 18)



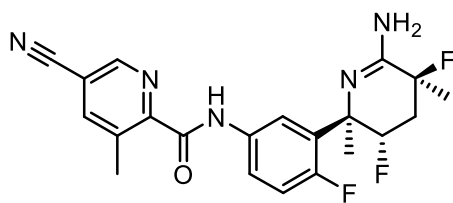
Preparada a partir de (3*R*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2,3-difluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-
 5 dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 2-(difluorometil)oxazol-4-carboxílico. **Ejemplo 19** *N*-(3-
 ((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-
 (metoxi- d_3)picolinamida (Compuesto 19)



Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-
 10 dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi- d_3)picolínico. **Ejemplo 20** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-
 amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-
 d_3)pirazina-2-carboxamida (Compuesto 20)

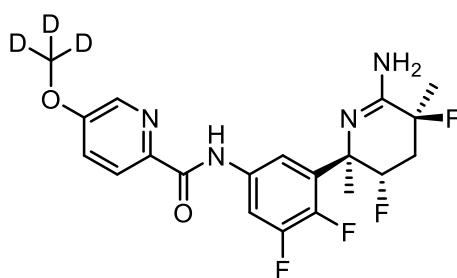


Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-
 15 dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi- d_3)picolínico. **Ejemplo 21** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-
 amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-
 metilpicolinamida (Compuesto 21)



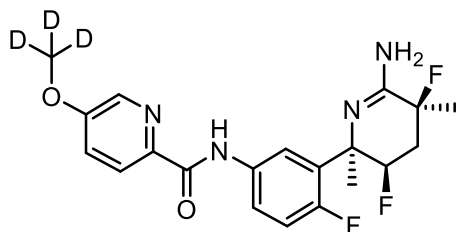
Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-cloropicolínico. **Ejemplo 22** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-

5 d_3)picolinamida (Compuesto 22)



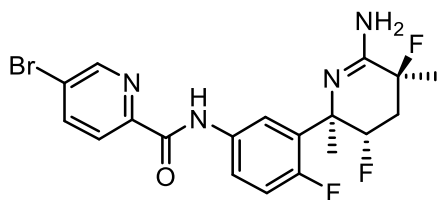
Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2,3-difluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(difluorometil)pirazina-2-carboxílico. **Ejemplo 23** *N*-(3-((2*R*,3*R*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-

10 (metoxi-*d*₃)picolinamida (Compuesto 23)



Preparada a partir de (3*S*,5*R*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-(metoxi-*d*₃)picolínico. **Ejemplo 24** *N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-

15 bromopicolinamida (Compuesto 24)



Preparada a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluoro-fenil)-3,5-difluoro-3,6-

dimetil-piperidina-2-tiona y ácido 5-bromopicolínico.

Estereoquímica

Se obtuvieron cristales mediante recristalización de 5-bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida a partir de una mezcla de heptano y acetato de etilo. La estructura de 5-bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida se dilucidó mediante cristalografía de rayos X de dichos cristales. La estructura muestra la configuración absoluta y relativa de 5-bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida. 5-bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida se preparó tal como se describe en el ejemplo 1 partiendo de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona y ácido 5-bromopicolínico.

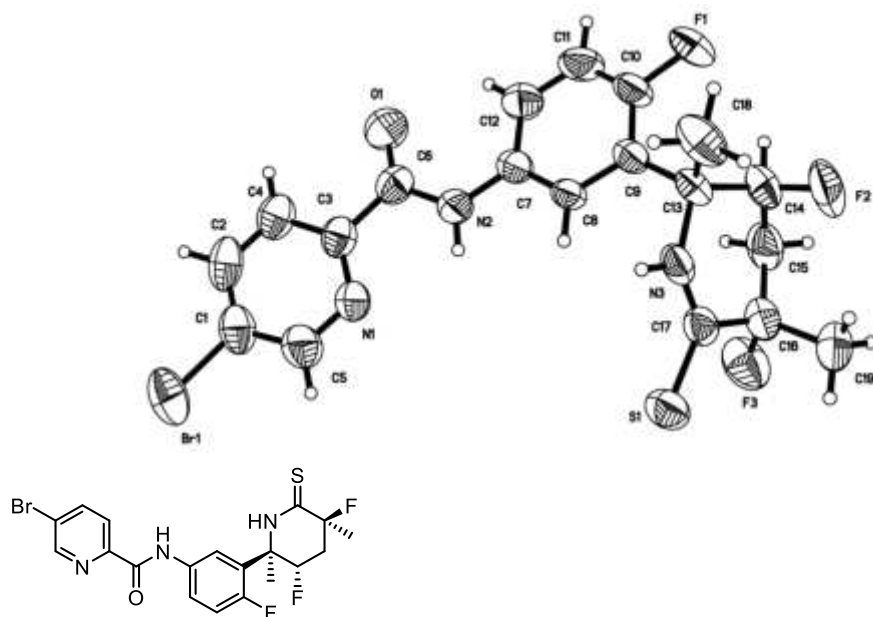
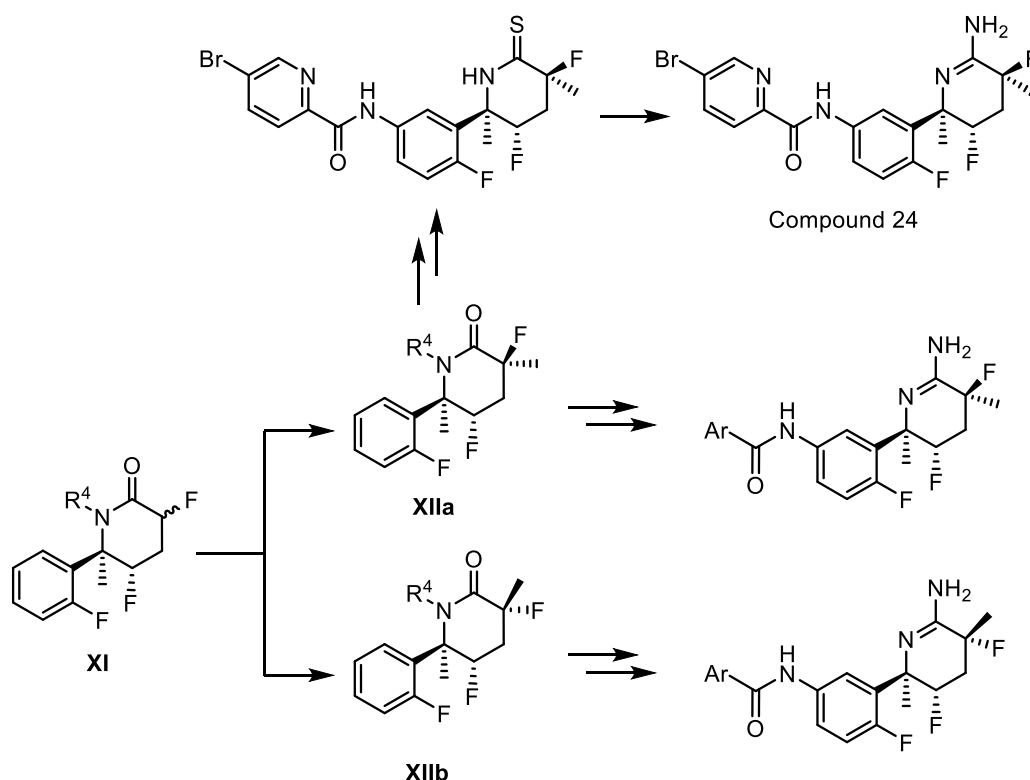


Figura 1: Estructura de rayos X de 5-bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida

Las configuraciones absolutas de los compuestos ejemplificados de la presente invención se pueden así racionalizar. 5-Bromo-*N*-(3-((2*R*,3*S*,5*S*)-3,5-difluoro-2,5-dimetil-6-tioxopiperidin-2-il)-4-fluorofenil)picolinamida se preparó a partir de (3*S*,5*S*,6*R*)-6-(5-amino-2-fluorofenil)-3,5-difluoro-3,6-dimetilpiperidina-2-tiona, la cual se preparó a partir de XIIa (R4 = *terc.*-butoxicarbonilo) tal como se muestra en el Esquema 7, confirmando así la

configuración absoluta de XIIa. Como consecuencia de ello, también se confirma la configuración absoluta de XIIb ($R^4 = \text{terc.}-\text{butoxicarbonilo}$).



Esquema 8. Fundamento para la asignación de la estereoquímica absoluta y

relativa de los compuestos ejemplificados. $R^4 = \text{terc.}-\text{butoxicarbonilo}$

Ensayo Farmacológico

Ensayo de unión a BACE1

El ensayo de unión se llevó a cabo como un ensayo basado en SPA utilizando una forma biotinilada de BACE1 humana expresada de manera recombinante y purificada posteriormente a partir de células HEK293 Freestyle. El ensayo de unión se llevó a cabo en un tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 4.5, que contenía NaCl 50 mM y 0.03% de Tween-20 en placas blancas de 384 pocillos de fondo transparente (Corning N.º 3653). 10 nM (concentración final) de radioligando ($[^3\text{H}]-N-((1S,2R)-1-\text{bencil}-3-\text{ciclopropilamino}-2-\text{hidroxi-propil})-5-(\text{metanosulfonil-metil-amino})-N-((R)-1-\text{fenil-etil})-\text{isofalamida}$)

(TRQ11569 adquirida de GE Healthcare) se mezclaron con compuesto de ensayo a una concentración dada, 6 nM (concentración final) de BACE1 humana y 25 μg de perlas de SPA con núcleo de PVT revestidas con Estreptavidina (RPNQ0007, GE Healthcare Life Sciences) en un volumen total de 40 μl . Se estudiaron varias concentraciones de cada

compuesto de prueba en el ensayo para la determinación de la Cl_{50} . Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se contaron en un contador Wallac Trilux. La unión total y la no específica se determinaron usando tampón y una concentración 1 μ M (concentración final) del inhibidor de BACE1 con una afinidad elevada de referencia (S)-6-[3-cloro-5-(5-prop-1-inilpiridin-3-il)tiofen-2-il]-2-imino-3,6-dimetiltetrahidropirimidin-4-ona, respectivamente. Para cada uno de los compuestos de ensayo se determinó el valor de Cl_{50} (la concentración que media en el 50% de la inhibición de la unión específica del radioligando) a partir de la curva concentración-respuesta y se utilizó para calcular la K_i a partir de la ecuación $K_i = Cl_{50} / (1 + L / K_d)$, en que L y K_d son la concentración final del radioligando utilizado en el ensayo y la constante de disociación del radioligando, respectivamente. La K_d del radioligando se determinó a partir de experimentos de unión por saturación.

Tabla 1: afinidad de unión de compuestos seleccionados

Compuesto Nº	BACE1 Ki (nM)
1	30
2	26
3	23
4	98
5	51
6	58
7	39
8	58
9	36
10	820
11	190
12	99

13	62
14	45
15	100
16	220
17	39
18	6.8
19	20
20	21
21	4.1
22	3.6
23	81
24	4.3

Ensayo de eficacia de BACE1

El ensayo de eficacia se llevó a cabo como un ensayo basado en FRET usando un kit de BACE1 comercializado (Life Technologies, P2985). Se preincubaron 2 µL de compuesto de prueba con una concentración 10 µM (concentración final) y 15 µL de enzima de BACE1 del kit (concentración final 3 nM) durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 15 µL de sustrato del kit (concentración final 250 nM) y se incubó durante 90 minutos más a temperatura ambiente. La placa del ensayo se leyó posteriormente en un Pherastar (Ex540/Em590). La actividad enzimática observada en presencia del compuesto de prueba se normalizó respecto a la actividad enzimática observada en presencia del tampón y una concentración 10 µM (concentración final) del inhibidor de referencia de BACE1 con afinidad elevada (S)-6-[3-cloro-5-(5-prop-1-inilpiridin-3-il)tiofen-2-il]-2-imino-3,6-dimetiltetrahidropirimidin-4-ona, respectivamente. La eficacia de los compuestos de prueba se evaluó con una concentración 10 µM (concentración final) y se definió como la inhibición porcentual de la actividad enzimática usando la ecuación %inhibición = 100% - actividad enzimática normalizada en porcentaje.

Tabla 2: Actividad BACE1 de compuestos seleccionados

Compuesto Nº	Inhibición de BACE1 con 10µM (%)
1	103
2	99
3	102
4	101
6	101
7	102
8	100
9	109
10	115
11	104
12	118
13	108
14	112
15	108
16	103
18	101
19	106
20	106
21	117
22	101
23	107
24	103

Evaluación de los niveles de A β en cerebro y plasma de rata tras la inhibición de**BACE1.****Animales.**

Todos los procedimientos para el cuidado de las ratas y experimentales fueron
5 aprobados por el Equipo de Veterinarios de Lundbeck, de acuerdo con la legislación
danesa. Las ratas se mantuvieron en una instalación con barrera con un ciclo de
luz/oscuridad de 12/12-h y acceso ad libitum a la comida y el agua.

Tratamiento de Ratas naif.

Se adquirieron ratas Sprague Dawley macho adultas jóvenes de
10 aproximadamente 250g de peso de Charles River, las cuales recibieron 0-30 mg/kg de
vehículo (10% de HP betaCD + 1M MeSO₄, pH 2.5) o compuestos de prueba (disueltos en
el vehículo) únicamente mediante sonda oral (vía oral). Los compuestos se dosificaron con
un volumen de 5 mL/kg. Se establecieron cohortes de 5-10 animales para cada
tratamiento de la afección.

15 Los animales que se sometieron a tratamiento fueron monitorizados de cerca por
el personal veterinario en busca de cualquier signo de toxicidad. La monitorización de
parámetros incluyó el peso corporal, apariencia física, cambios en la apariencia del pelo,
casos de comportamiento no provocado y respuestas lentas o exageradas a estímulos
externos.

20 **Recogida del tejido.**

A T = 180 minutos después de la dosificación inicial los animales fueron aturdidos
y decapitados con una guillotina. Se tomó sangre del tronco en tubos revestidos con EDTA
después de la decapitación del animal. La sangre se centrifugó a 2200G a 4°C durante 15
minutos y el plasma se recogió y congeló a -80°C. La sangre se dividió en alícuotas para el
25 análisis de A β por ELISA y de DMPK. Inmediatamente después de sacrificarlos, se extrajo el
cerebro y se cortó en 2 mitades. Los hemisferios cerebrales derechos se enfriaron
rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C. Se disecó la mitad izquierda; el
prosencéfalo frontal se tomó para el análisis por ELISA de A β y el resto se utilizó para

análisis de DMPK. Estas muestras también se enfriaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su uso para análisis.

Procesamiento del tejido.

Las muestra de cortex se descongelaron ligeramente en hielo húmedo antes de
5 homogeneizarlas con un instrumento de dispersión de pequeño volumen (T10 basic
ULTRA-TURRAX®) que se ajustó a una velocidad de 5 durante aproximadamente 5-7 s. El
tejido se proceso en un volumen de 10 veces el peso, por ejemplo 100 mg de tejido se
homogeneizaron en 1000 µL de tampón de homogeneización. Tampón de
homogeneización: 50 mL de agua Milli Q + NaCl 50 nM + 0.2% de Dietilamina (DEA) + 1
10 comprimido de cóctel inhibidor de Proteasa Completa + inhibidor de la serín proteasa
irreversible clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo 1 nM (AEBSF).

Después de la homogeneización, se recogieron alícuotas de 450 µL de las
muestras en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se colocaron en hielo húmedo, se añadió NP-
40 al 0.5% (50 µL) a todas las muestras y a continuación se incubaron en hielo durante 30
15 min. Después de ese tiempo se sonicaron todas las muestras utilizando un
homogeneizador Ultrasonic con un conjunto de 10 pulsos de un sonido homogéneo de 20
kHz (SONOPLUS HD2070, Bandelin Electronic) a una potencia de un 12-13% para extraer
todas las especies de Aβ. A continuación se centrifugaron las muestras (Microcentrífuga
Ole Dich 157 MPRF) a 20 000G durante 20 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, se
20 pipetearon 285 µL del sobrenadante a microtubos de 600 µL y se neutralizaron con 15 µL
de tampón Tris-HCl 1 M.

Protocolo de ELISA.

Se utilizó el kit de Abeta amiloide (40) de humano/rata WAKO 294-62501 para
todos los análisis por ELISA. Se colocaron 30 µL de muestras de plasma o 30 µL de los
25 sobrenadantes de corteza generados tal como se ha descrito anteriormente en
microtubos de 600 µL sobre hielo húmedo. A esto se añaden 30 µL de Urea 8 M
(AppliChem A1049, 9025) para diluir a la mitad. Tanto el plasma como los sobrenadantes
de la corteza se incubaron en hielo durante 30 min. Se prepararon filas estándar a partir

de la solución madre de péptido estándar que se proporciona en el kit y diluyente estándar que contiene urea 1.6 M (200 μ L de Urea 8M + 800 μ L de diluyente estándar) y urea 0.8M (400 μ L de Urea 8M + 3600 μ L de diluyente estándar). Se preparó una dilución doble en serie de A β 40 de 100 pmol/ml a 0 pmol/L para el ensayo.

5 Después de la incubación con urea, todas las muestras se diluyeron adicionalmente mediante la adición de 5 veces el diluyente estándar del Kit. Esto se realizó añadiendo 240 μ L de Diluyente Estándar a 60 μ L de mezcla de muestra/urea que después se mezcló bien. Se pipetearon 100 μ L de cada muestra diluida en los pocillos designados de la placa de ELISA por duplicado. A continuación se cubrió la placa y se
10 incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el kit ELISA se atemperó a temperatura ambiente antes de su uso. La placa incubada se lavó 5 veces con la solución de lavado 20x diluida en agua MiliQ. Se añadieron 100 μ L de HRP-conjugado en cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó a 4 °C durante 1 h. El lavado se repitió de nuevo 5 veces. 100 μ L de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) se aplicaron a cada uno
15 de los pocillos y la placa se cubrió e incubó en la oscuridad a la temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 100 μ L de solución de PARADA a cada pocillo y la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro (Labsystems Multiscan Ascent) en los 30 min posteriores a la adición de la solución de PARADA a los pocillos.

20 La concentración de A β en las muestras se determinó en función de una curva estándar generada a partir de patrones que contienen concentraciones conocidas de A β 40 sintético. Los expertos en la técnica apreciarán que las extracciones de dietilamina (DEA) y urea liberarán A β soluble y A β insoluble, respectivamente. Dado que el kit de ELISA está validado y se utiliza ampliamente, se acepta que siempre que las condiciones de
25 tratamiento y las condiciones de ensayo sean las mismas para cada compuesto estudiado, entonces el ensayo debería producir datos sólidos y coherentes para los compuestos estudiados y producir discrepancias mínimas.

Análisis de los datos

Para determinar la concentración de A β 40 en las muestras, los valores interpolados de las muestras que se añaden en las placas se multiplican por 20 para dar cuenta de las diluciones realizadas cuando se sumaron los volúmenes de DEA, urea y
5 solución de neutralización. Los valores se calculan como un cambio porcentual en A β 40 en comparación con los animales tratados con vehículo.

El Compuesto 4 se administró a dosis de 10 mg/kg p.o. Y se recogieron muestras de cerebro y plasma a las 3 horas post-dosis y las siguientes exposiciones se midieron como se describe arriba.

10 Bioanálisis de muestra de cerebro y plasma

Se determinó TC en homogeneizados de cerebro y plasma utilizando la cromatografía líquida de ultrarresolución[®] (UPLC[®]) y a continuación la detección por MS tándem (MS/MS).

Aparatos:

15 Tecan Genesis RSP 200; Biomek NXP, Beckman Coulter; centrífuga Sigma 4K15; Acquity UPLC, Waters; Sciex API4000 TQ, Applied Biosystems; MS software: Analyst versión 1.4.1

Reactivos químicos

Acetonitrilo, calidad HPLC, Fluka, N.º 34967N; Metanol, calidad HPLC, Sigma-
20 Aldrich, Lot 9003S; Ácido fórmico, calidad HPLC, Riedel-de Haën, Lot 51660; Agua purificada, Millipore Synergy UV

Preparación de la muestra

Se preparó un homogeneizado de cerebro homogeneizando el cerebro 1:4 (v/v) con agua:2-propanol:DMSO (50:30:20 v/v/v), seguido de la centrifugación y recogida del
25 sobrenadante. Se prepararon los patrones de calibración y muestras QC utilizando un robot Hamilton. Se añadieron 150 μ L de ISTD en acetonitrilo (1 ng/mL de ISTD) a 25 μ L de los patrones de calibración, las muestras QC y las muestras de prueba (homogeneizado de cerebro y plasma) utilizando un robot Biomek. Después de la centrifugación (6200 g, 4 °C,

20 min) se transfirieron 100 µL de sobrenadante de cada muestra a una placa nueva y se mezclaron con 100 µL de agua con un 0.1% de ácido fórmico utilizando un robot Biomek (archivo del método transferencia in vivo). Tras una centrifugación rápida (6200 g, 4 °C, 5 min) se colocaron las muestras en el automuestreador.

5 Análisis de UPLC-MS/MS

Se realizó la detección MS/MS con un instrumento Applied Biosystems Sciex API 4000 en modo de ionización por electronebulización de iones positivos. Se detectaron TC e ISTD con una relación de masa respecto a carga (m/z) del compuesto original > derivado. Se utilizó nitrógeno para los gases nebulizadores y de colisión. El área del pico presentó una correlación lineal con la concentración en plasma y cerebro de los analitos en el intervalo de 1.00 – 1000 ng/mL de plasma y 5.00 – 5000 ng/g de cerebro (corregida respecto a la dilución). Si la concentración del fármaco en la muestra de plasma/cerebro fue superior a 1000 ng/mL o 5000 ng/g, la muestra se diluyó de manera apropiada en el homogeneizado de plasma blanco/cerebro blanco antes del análisis.

15 Sistema cromatográfico

Columnas analíticas:

Waters Acquity UPLC HSS C18 SB (pH 2-8) 1.8 µm, 2.1 x 30 mm.

Fase móvil A: 0.1% de ácido fórmico ac. o 0.1% de hidróxido de amonio ac.

Fase móvil B: Acetonitrilo con un 0.1% de ácido fórmico ac. o un 0.1% de hidróxido de amonio ac.

Lavado suave: Metanol

Lavado fuerte: Acetonitrilo/Isopropanol/Ácido fórmico (50/50/2 v/v/v)

Flujo: 0.6 mL/min

Tiempo de ejecución: 3 min.

A residuos: 0-0.5 min

Temperatura: 40°C

Gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
--------------	-----	-----

Tabla 3: Resultados para el compuesto 3

	Dosis (mg/kg)	Exp (ng/g)	Relación Cerebro/Plasma	Reducción de Aβ40 (%)
Cerebro Rata	10	671	1.4	35
Plasma Rata		489		24
Cerebro Rata	30	1510	0.83	61
Plasma Rata		1826		53

Tabla 4: Resultados para el compuesto 19

	Dosis (mg/kg)	Exp (ng/g)	Relación Cerebro/Plasma	Reducción de Aβ40 (%)
Cerebro Rata	10	1025	2.2	56
Plasma Rata		473		49
Cerebro Rata	30	2772	2.3	66
Plasma Rata		1198		53

5 Tabla 5: Resultados para el compuesto 20

	Dosis (mg/kg)	Exp (ng/g)	Relación Cerebro/Plasma	Reducción de Aβ40 (%)
Cerebro Rata	3	610	2.2	52
Plasma Rata		272		64

Tal como se muestra en las tablas 3, 4 y 5, compuestos de la presente invención son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica y muestran eficacia en el SNC.

Ensayo MDCK-MDR1

10 Se evaluó la permeabilidad de los compuestos de prueba en células MDCK-MDR1 que se cultivaron hasta alcanzar la confluencia (4-6 días) en una placa de 96 pocillos transwell. Los compuestos de prueba se diluyeron con el tampón de transporte (HBSS +

1% de BSA) hasta una concentración de 0.5 µM y se añadieron a la parte apical o basolateral de la monocapa de células. Se determinó la permeación de los compuestos de prueba en dirección de A a B o en dirección de B a A por triplicado a lo largo de un tiempo de incubación de 60 minutos a 37 °C y con un 5% de CO2 con una humedad relativa de un 95%. Se cuantificaron los compuestos de prueba mediante un análisis de LC-MS/MS en función de las relaciones de área de los picos de analito/IS tanto en los pocillos receptores como donantes de la placa transwell.

Se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente P_{app} (cm/s) utilizando la ecuación:

$$P_{app} = (dC_r/dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

Donde dC_r/dt es la concentración acumulada del compuesto en la cámara receptora en función del tiempo (µM/s); V_r es el volumen de la solución en la cámara receptora (0.05 mL en la parte apical; 0.25 mL en la parte basolateral); A es el área de superficie para el transporte, es decir 0.0804 cm² para el área de la monocapa; C_0 es la concentración inicial en la cámara donante (µM).

Los compuestos se clasifican como sustratos Pgp cuando la relación de salida ($P_{app}^{BA} / P_{app}^{AB}$) es ≥ 2 .

Tabla 5: Actividad BACE1 de compuestos seleccionados

Compuesto	Relación de salida MDCK- MDR1
1	1.09
2	0.79
3	0.96
4	1.17
5	1.53
6	1.1
7	5.67

8	0.95
9	1.31
13	11.7
14	15.76
15	2.07
16	1.6
17	0.45
18	1.24
19	0.79
20	0.85
21	1.15
22	0.52
23	0.95

Tal como se muestra en las tablas 5, la mayoría de los compuestos ejemplificados de la presente invención tienen relaciones de salida MDCK-MDR1 por debajo de 2 y, por lo tanto, es probable que sean capaces de cruzar la barrera hematoencefálica .

5

10

15

20

25