



MD/EP 3573983 T2 2021.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3573983 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 417/14 (2006.01.01)
A61P 25/00 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)
A61K 31/445 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2019 1326</p> <p>(22) Data de depozit: 2018.01.19</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18703154.7, 2018.01.19</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3573983, 2019.12.04</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201762451137 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.01.27</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2021, 2021.10.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 16/2021, 2021.04.21</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2020, 2020.01.31</p>
<p>(71) Solicitant: ELI LILLY AND COMPANY, US</p> <p>(72) Inventatori: DREYFUS Nicolas Jacques Francois, US; LINDSAY-SCOTT Peter James, US</p> <p>(73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>	

(54) N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă în calitate de inhibitor OGA

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție furnizează un compus cu Formula (I) sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, și utilizarea compușilor cu Formula (I) pentru tratamentul

2
bolilor sau tulburărilor neurodegenerative, cum ar fi boala Alzheimer.
Revendicări: 12

MD/EP 3573983 T2 2021.10.31

(54) N-[4-fluoro-5-[(2s,4s)-2-methyl-4-[(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methoxy]-1-piperidyl]methyl]thiazol-2-yl]acetamide as oga inhibitor

(57) Abstract:

1
The present invention provides a compound of Formula (I): or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and the use of compounds of Formula (I) for

2
treatment of neurodegenerative diseases and disorders, such as Alzheimer's disease.
Claims: 12

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Prezenta invenție se referă la noi compuși 5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il, la compoziții farmaceutice cuprinzând compușii, la compușii pentru utilizare în tratamentul tulburărilor fiziologice, și la intermediari și procedee utile în sinteza compușilor.

10 Prezenta invenție este în domeniul tratamentului bolii Alzheimer, paraliziei supranucleare progresive (PSP) și a altor boli și tulburări care implică neurodegenerarea mediată de tau, cunoscută colectiv ca tauopatie.

15 Boala Alzheimer este o tulburare neurodegenerativă devastatoare care afectează milioane de pacienți în întreaga lume. În lumina agenților aprobați în prezent pe piață care aduc doar beneficii tranzitorii, simptomatice pacientului, există o necesitate semnificativă nesatisfăcută în tratamentul bolii Alzheimer.

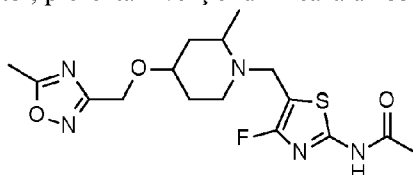
20 Oligomerizarea proteinei tau asociată cu microtubulele din structurile filamentoase cum ar fi filamentele elicoidale imperecheate (PHF-uri) și filamentele drepte sau răsucite, care dau naștere la încâlciri neurofibrilare (NFT-uri) și fire neuropile (NT-uri), este una dintre caracteristicile patologice de definire a bolii Alzheimer și a altor tauopatii. S-a descoperit că numărul de NFT-uri din creierele indivizilor cu boală Alzheimer este strâns corelat cu severitatea bolii, sugerând că tau are un rol cheie în disfuncția și neurodegenerarea neuronală (Nelson și colab., JNeuropathol Exp Neurol., 71(5), 362-381(2012)). S-a arătat că patologia tau se corelează cu durata bolii în PSP; cazurile cu un curs mai agresiv al bolii au o sarcină tau mai ridicată decât 25 cazurile cu un progres mai lent. (Williams și colab., Brain, 130, 1566-76 (2007)).

30 Studiile recente (Yuzwa și colab., Nat Chem Biol, 4(8), 483-490 (2008)) susțin potențialul terapeutic al inhibitorilor *O-GlcNAcase* (OGA) pentru a limita hiperfosforilarea și agregarea tau în tau patologic pentru tratamentul bolii Alzheimer și tulburărilor neurodegenerative mediate de tau înrudite. Specific, inhibitorul OGA Tiamet-G a fost legat de încetinirea pierderii neuronilor motori în modelul tau JNPL3 la șoarece (Yuzwa și colab., Nat Chem Biol, 8, 393-399 (2012)) și de o reducere în patologia tau și în neuritele distrofice în modelul tau Tg4510 la șoarece (Graham și colab., Neuropharmacology, 79, 307-313 (2014)). Corespunzător, inhibitorii OGA sunt recunoscuți ca abordare terapeutică validă pentru a reduce acumularea de forme hiperfosforilate, 35 patologice de tau, cum ar fi NFT-urile și NT-urile.

40 Brevetul S.U.A. nr. 9.120.781 divulgă derivați hexahidrobenzooxazol și hexahidrobenzotiazol care posedă activitate inhibitoare OGA și sunt divulgați ca utili în tratarea bolilor și tulburărilor înrudite cu deficiența sau supraexprimarea de OGA, și/sau acumularea sau deficiența de 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranoside (*O-GlcNAc*). În plus, US 2016/0031871 divulgă anumiți inhibitori de glicosidază pentru tratarea bolii Alzheimer.

45 Inhibitorii OGA care sunt penetranți în creier sunt doriți pentru a furniza tratamente pentru tulburările neurodegenerative mediate de tau, cum ar fi boala Alzheimer și PSP. Prezenta invenție furnizează anumiți noi compuși care sunt inhibitori de OGA.

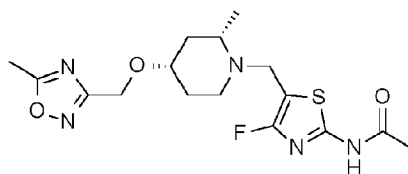
Corespunzător, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I:



Formula I

50 sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

În plus, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula Ia:



Formula Ia

sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

5 Mai mult, această invenție furnizează un compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora pentru utilizare în terapie, în particular pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer sau pentru utilizare în prevenirea progresului deprecierei cognitive usoare cu boala Alzheimer. În plus, această invenție furnizează un compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora pentru utilizare în tratamentul paraliziei supranucleare progresive.

10 Invenția furnizează de asemenea un compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora pentru utilizare în tratarea tulburărilor neurodegenerative mediate de tau.

15 Chiar mai mult, această invenție furnizează utilizarea unui compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul bolii Alzheimer sau pentru prevenirea progresului unei deprecierei cognitive ușoare cu boala Alzheimer. În plus, această invenție furnizează utilizarea unui compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul paraliziei supranucleare progresive. Invenția furnizează de asemenea utilizarea unui compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative mediate de tau.

25 Invenția mai furnizează o compoziție farmaceutică, cuprinzând un compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. Invenția mai furnizează un procedeu pentru prepararea unei compoziții farmaceutice, cuprinzând amestecarea unui compus cu Formulele I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora, cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. Această invenție cuprinde de asemenea noi intermediari și procedee pentru sinteza compușilor cu Formulele I și Ia.

30 Deprecierea cognitivă ușoară a fost definită ca potențială fază prodromală de demență asociată cu boala Alzheimer pe baza prezentării clinice și a progresului pacienților care prezintă depreciere cognitivă ușoară cu demență Alzheimer în timp. Termenul „prevenirea progresului deprecierei cognitive ușoare cu boala Alzheimer“ include restrângerea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului deprecierei cognitive ușoare cu boala Alzheimer la un pacient.

35 Așa cum s-a utilizat în acest document, termenii „tratarea“ sau „pentru a trata“ includ restrângerea, încetinire, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom sau tulburare existente.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „pacient“ se referă la un om.

40 Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „cantitate eficientă“ se referă la cantitatea sau doza compusului invenției, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia care, după o singură sau multiple doze administrate pacientului, furnizează efectul dorit la pacientul sub diagnostic sau tratament.

45 O cantitate eficientă poate fi cu ușurință determinată de către o persoană calificată în domeniu prin utilizarea tehnicilor cunoscute și prin observarea rezultatelor obținute în circumstanțe anologice. În determinarea cantității eficiente pentru un pacient, este luat în considerare un număr de factori, incluzând, dar fără a se limita la: speciile de pacienți; dimensiunea, vârsta, și sănătatea generală a acestora; boala sau tulburarea specifică implicată; gradul, sau implicarea sau severitatea bolii sau tulburării; răspunsul pacientului individual; compusul particular administrat; modul de administrare; caracteristicile de biodisponibilitate ale preparatului administrat; regimul de dozare selectat; utilizarea medicației concomitente; și alte circumstanțe relevante.

55 Compușii prezentei invenții sunt în general eficienți pe un interval de dozare larg. De exemplu, dozajele pe zi se încadrează în mod normal în intervalul de la aproximativ 0,1 până la aproximativ 15 mg/kg din greutatea corporală. În unele cazuri niveluri ale dozajului sub limita

inferioară a intervalului menționat mai sus pot fi mai mult decât adecvate, în timp ce în alte cazuri încă doze mai mari pot fi utilizate cu efecte secundare acceptabile.

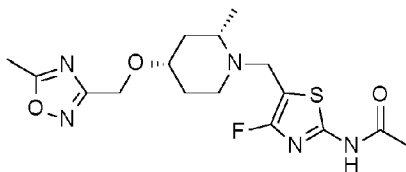
5 Compușii prezentei invenții sunt formulați preferabil ca compoziții farmaceutice administrate pe orice cale care face compusul biodisponibil, incluzând căile orale și transdermale. Cel mai preferabil, astfel de compoziții sunt pentru administrare orală. Astfel de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea acestora sunt bine cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen, Editor, ediția a 2-a, Pharmaceutical Press, 2012).

10

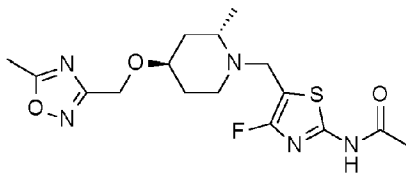
Compușii cu Formulele I și Ia, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora sunt în special utili pentru utilizările terapeutice ale invenției, dar anumite configurații sunt preferate. Următoarele paragrafe descriu astfel de configurații preferate. Se va înțelege că aceste preferințe sunt aplicabile atât utilizărilor terapeutice cât și compușilor invenției.

15

Compușii prezentei invenții includ:

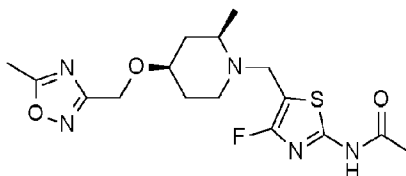


Formula Ia

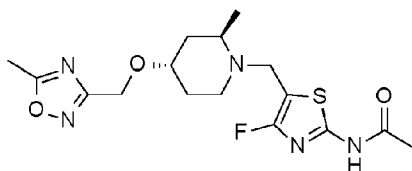


Formula Ib

20



Formula Ic



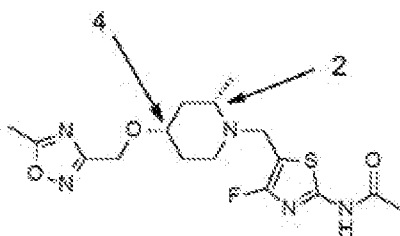
Formula Id

25

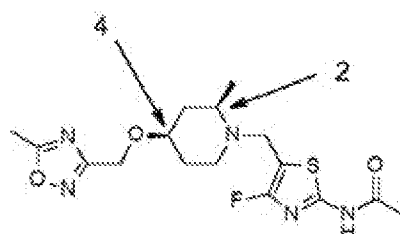
și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora.

30 Compusul cu Formula I în care substituenții metil și oxigen pe inelul de piperidină sunt în configurație *cis* sau *trans*, sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestora, sunt incluși în domeniul invenției, cu configurația *cis* fiind preferată. De exemplu, cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că metilul din poziția 2 este în configurație *cis* față de oxigenul din poziția 4 așa cum se arată în Schema A mai jos:

Schema A



Formula Ia

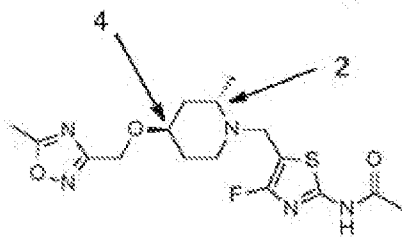


Formula Ic

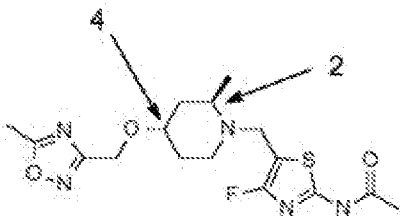
În plus, cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că metilul din poziția 2 este în configurație *trans* față de oxigenul din poziția 4 așa cum se arată în Schema B mai jos:

5

Schema B



Formula Ib



Formula Id

Compușii în care centrul chiral în poziția 2 a inelului de piperidină este în configurație S sunt preferați în continuare. Deși prezenta invenție are în vedere toți enantiomerii și diastomerii individuali, precum și amestecuri de enantiomeri ai respectivilor compuși, incluzând racemații, compușii cu configurația absolută cum s-a stabilit mai jos sunt în special preferați:

10

N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil] tiazol-2-il]acetamidă, și săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia; și N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă sunt în special preferați.

15

Forma cristalină de N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă este în special preferată. Forma cristalină de N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă care este caracterizată printr-un maxim în spectrul de difracție cu raze X pe pulbere la unghiul de difracție 2-teta de 12,1° în combinație cu unul sau mai multe maxime selectate din grupul constând din 15,3°, 21,6°, 22,2°, 22,7°, 23,5°, 24,3°, și 26,8°, cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade, este în plus preferată.

20

Izomerii, enantiomerii, și diastereomerii individuali pot fi separați sau rezolvați de cineva având calificare obișnuită în domeniu la orice punct convenabil în sinteza compușilor invenției, prin metode cum ar fi tehnici de cristalizare selective sau cromatografie chirală (vezi de exemplu, J. Jacques, și colab., „Enantiomers, Racemates, and Resolutions”, John Wiley & Sons,

25

Inc., 1981, și E.L. Eliel și S.H. Wilen“, Stereochemistry of Organic Compounds“, Wiley-Interscience, 1994).

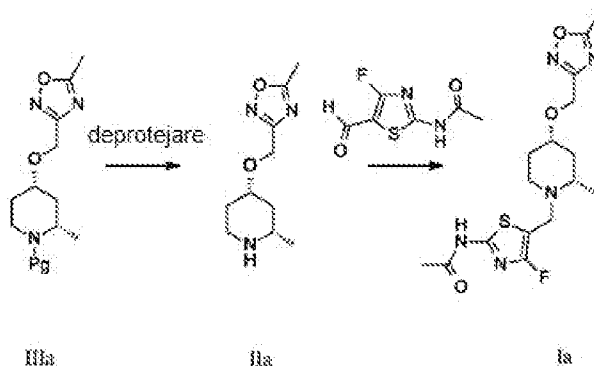
O sare acceptabilă farmaceutic a compușilor invenției poate fi formată, de exemplu, prin reacția unei baze libere adecvate dintr-un compus al invenției și un acid acceptabil farmaceutic adecvat într-un solvent adecvat în condiții standard bine cunoscute în domeniu. Formarea de astfel de săruri este bine cunoscută și apreciată în domeniu. Vezi, de exemplu, Gould, P.L., „Salt selection for basic drugs“, International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., și colab. „Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities“, Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); și Berge, S.M., și colab., „Pharmaceutical Salts“, Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977).

Compușii prezentei invenții, sau sărurile acestora, pot fi preparate printr-o varietate de proceduri cunoscute cuiva având calificare obișnuită în domeniu, din care unele sunt ilustrate în schemele, preparările, și exemplele de mai jos. Cineva având calificare obișnuită în domeniu recunoaște că etapele de sinteză specifice pentru fiecare din căile descrise pot fi combinate în diferite moduri, sau în conjuncție cu etape din diferite scheme, pentru a prepara compușii invenției, sau sărurile acestora. Produsele fiecărei etape în schemele de mai jos pot fi recuperate prin metode convenționale bine cunoscute în domeniu, incluzând extragerea, evaporarea, precipitarea, cromatografia, filtrarea, triturarea, și cristalizarea. În schemele de mai jos, toți substituenții, dacă nu se indică altfel, sunt cum s-au definit anterior. Reactivii și materiile prime sunt cu ușurință disponibile cuiva având calificare obișnuită în domeniu. Următoarele scheme, preparări, și exemple sunt furnizate pentru a ilustra suplimentar invenția. În plus, cineva având calificare obișnuită în domeniu apreciază că compușii cu Formulele Ia, Ib, Ic, și Id pot fi preparați prin utilizarea materiei prime cu configurația stereochemică corespunzătoare care poate fi preparată de o persoană calificată în domeniu. De exemplu, Schemele de mai jos utilizează materii prime cu configurația corespunzătoare în final Formulei Ia.

În general, un compus cu Formula Ia poate fi preparat dintr-un compus cu Formula II (Schema 1). Mai specific, un compus cu Formula IIa este alchilat reductiv cu N-(4-fluoro-5-formiltiazol-2-il)acetamidă în prezența unui agent reducător adecvat cum ar fi triacetoxiborohidru de sodiu într-un solvent adecvat pentru a furniza un compus cu Formula Ia într-un solvent adecvat, cum ar fi acetat de etil. N-(4-fluoro-5-formiltiazol-2-il)acetamida poate fi preparată prin metode cunoscute în domeniul chimic precum și prin metode furnizate în următoarele Preparări și Exemple.

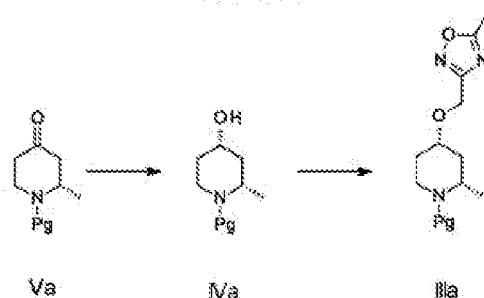
Un compus cu Formula IIa poate fi preparat dintr-un compus cu Formula IIIa unde Pg este o grupare de protecție amină adecvată. Mai specific, un compus cu Formula IIa unde Pg este carboxilat de terț-butil (t-BOC) este reacționat cu un acid cum ar fi acidul clorhidric sau acidul trifluoroacetic într-un solvent adecvat cum ar fi dioxan sau diclorometan pentru a furniza un compus cu Formula IIa. Grupările de protecție amină adecvate sunt cunoscute în domeniul chimic și includ t-BOC și Cbz precum și pe cele discutate în T. W. Green, P. G. M. Wuts, „Protective Groups in Organic Synthesis“ Wiley-Interscience, New York, 1999.

Schema 1

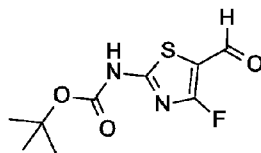


- Un compus cu Formula IIIa unde Pg este o grupare de protecție amină adecvată poate fi preparat dintr-un compus cu Formula IVa (Schema 2). Mai specific, un compus cu Formula IVa unde Pg este carboxilat de terț-butil este reacționat cu 3-(clorometil)-5-metil-1,2,4-oxadiazol în prezența unei baze cum ar fi terț-butoxid de sodiu pentru a furniza un compus cu Formula IIIa.
- 5 Reacția este efectuată convenabil într-un solvent cum ar fi acetonitril sau dimetilformamidă. Un compus cu Formula IVa unde Pg este carboxilat de terț-butil poate fi preparat în mod esențial cum s-a descris în WO 2004/094380 A1. Mai specific, un compus cu Formula Va este reacționat cu un agent reducător cum ar fi tri(sec-butil)borohidruură de litiu într-un solvent cum ar fi tetrahidrofuran pentru a furniza un compus cu Formula IVa unde Pg este carboxilat de terț-butil. Un compus cu
- 10 Formula Va unde Pg este o grupare de protecție amină adecvată poate fi preparat prin procedee cunoscute în domeniul chimic incluzându-le pe cele descrise în WO 2004/094380 A1.

Schema 2

**Preparare 1**

- 15 **Sinteză de N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)carbamat de terț-butil.**



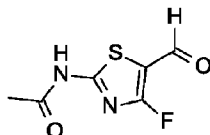
20

- Se adaugă fluorură de cesiu (227 g, 1480 mmol) la o soluție de N-(4-cloro-5-formil-tiazol-2-il)carbamat de terț-butil (38,8 g, 148 mmol; pentru prepararea N-(4-cloro-5-formil-tiazol-2-il)carbamatului de terț-butil vezi de exemplu, N. Masuda, și colab., Bioorg Med Chem, 12, 6171-6182 (2004)) în DMSO (776 mL) la temperatura camerei. Amestecul de reacție este agitat
- 25 într-un bloc de încălzire la 145°C cu o temperatură internă de 133°C timp de 48 ore, apoi amestecul este răcit într-o baie de apă cu gheață. La amestec se adaugă soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (500 mL), saramură (500 mL) și acetat de etil (500 mL). Amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi este filtrat prin pământ de diatomee, spălat cu acetat de etil (500 mL). Filtratul este transferat la o pâlnie de separare și straturile sunt separate,
- 30 apoi stratul apos este extras cu acetat de etil (1 L). Organicele combinate sunt spălate cu saramură (1 L), apoi stratul de saramură este extras cu acetat de etil (300 mL). Organicele combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pentru a da un reziduu. Reziduu este trecut printr-un strat de gel de siliciu (330 g) eluând cu 5% acetat de etil în diclorometan (1,5 L) și filtratul este concentrat pentru a da un reziduu (24,2 g).

35

- Reziduu (32,7 g din loturile combinate, 133 mmol) este dizolvat în izopropanol (303 mL), filtrat și apoi este purificat prin SFC (cromatografie în fluid supercritic) utilizând o coloană IC (derivat polizaharidic de celuloză: tris (3,5-diclorofenilcarbamate, 30 x 250mm, 5u) cu 10% IPA (fără aditiv) la 180 mL/minut cu injecții de 3 mL. Frațiunile care conțin produsul sunt concentrate
- 40 pentru a da compusul din titlu (16,1 g. MS m/z 247,0 (M+H)).

Preparare 2**Sinteza N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)acetamidei (Metoda A)**



Intr-un vas învelit, se adaugă bromură de zinc (91,9 g, 408 mmol) într-o porție la un amestec de N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)carbamat de terț-butil (33,5 g, 136 mmol) și diclorometan (503 mL) la temperatura camerei. Amestecul de reacție este agitat peste noapte la o temperatură internă de 37°C, apoi temperatura învelișului este stabilită la -10°C și se adaugă tetrahidrofuran (111 mL) în picătură peste 15 minute, menținând o temperatură internă sub 6°C. Temperatura învelișului este apoi setată la -30°C și se adaugă piridină (110 mL, 1360 mmol) în picătură peste 5 minute, menținând o temperatură internă sub 5°C. Temperatura învelișului este stabilită la 0°C și se adaugă anhidridă acetică (116 mL, 1220 mmol) în picătură peste 5 minute. Amestecul de reacție este agitat peste noapte la o temperatură internă de 37°C, apoi este răcit la temperatura camerei și trecut printr-un strat scurt de pământ de diatomee, eluând cu tetrahidrofuran (500 mL). Filtratul este transferat la un flacon și amestecul este concentrat pentru a da un reziduu, care este concentrat din toluen (50 mL). La reziduu se adaugă o soluție de monohidrat de acid citric (57,2 g, 272 mmol) în apă (400 mL) și 2-metiltetrahidrofuran (400 mL) și amestecul este agitat la 40°C timp de 5 minute, apoi este trecut printr-un strat scurt de pământ de diatomee, eluând cu 2-metiltetrahidrofuran (100 mL). Filtratul este transferat la o pâlnie de separare și straturile sunt separate. Stratul apos este extras cu 2-metiltetrahidrofuran (2 ? 250 mL) și organicele combinate sunt diluate cu apă (500 mL). La amestec se adaugă bicarbonat de sodiu solid în porții peste 5 minute cu agitare până când evoluția gazului se oprește. Amestecul este transferat la o pâlnie de separare și straturile sunt separate, apoi stratul apos este extras cu 2-metiltetrahidrofuran (200 mL și 100 mL). Organicele combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pentru a da un reziduu, care este diluat cu 2-metiltetrahidrofuran (100 mL) și amestecul este trecut printr-un tampon scurt de gel de siliciu (250 g), eluând cu 2-metiltetrahidrofuran (2,5 L). Filtratul este concentrat pentru a da un reziduu care este suspendat într-un amestec 1:1 de diclorometan și heptan (202 mL). Amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 30 minute și apoi filtrat. Filtratul solid este uscat sub vid la 40°C timp de 2 ore pentru a da compusul din titlu (18,0 g, 70%). MS m/z 189,0 (M+H).

Sinteză alternativă de N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)acetamidă (Metoda B).

Se adaugă diclorometan (1325 g, 15,6 mol) la 2-amino-4-clorotiazol-5-carbaldehidă (100 g, 0,61 mol) și piridină (194,6 g, 2,46 mol), și se răcește la 0-5°C. Se adaugă anhidridă acetică (188,4 g, 1,85 mol) în picătură, menținând temperatura la 0-5°C. După ce adăugarea este completă, se ajustează temperatura până la 20-25°C și se agită timp de 41 ore. Se concentrează sub presiune redusă urmată de adăugarea de 35% HCl apos (200 mL) și apă (1,5 L), menținând temperatura la mai puțin de 40°C. Se răcește la 20-25°C și se agită timp de 18 ore. Se filtrează amestecul și se spală solidul colectat cu apă. Se usucă solidele la 60-65°C timp de 24 ore pentru a furniza N-(4-cloro-5-formiltiazol-2-il)acetamidă (75 g, 0,4 mol).

Sub o atmosferă inertă, se adaugă sulfolan (1000 ml) la N-(4-cloro-5-formiltiazol-2-il)acetamidă (50 g, 0,244 mol, preparat direct mai sus), tetrametilclorură de amoniu (107,1 g, 0,977 mol), și fluorură de cesiu (370,6 g, 2,44 mmol). Se încălzește până la 130°C și se agită timp de 23 ore. Analiza HPLC prezintă o conversie de 75% cu un randament in situ de 45% al compusului din titlu.

45

Sinteză alternativă de N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)acetamidă (Metoda C).

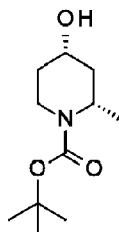
Se adaugă 2-propanol (150 mL) la tetrahidratul de fluorură de tetrametilamoniu (10,2 g, 109,0 mmol) și se concentrează amestecul până la 2-3 volume sub vid cu temperatura internă menținută la 70°C pentru a îndepărta apa. Se adaugă 2-propanol (200 mL) și se concentrează amestecul până la 2-3 volume sub vid. Se repetă de încă două ori. Se adaugă DMF (200 mL) și se concentrează până la 2-3 volume sub vid. Se adaugă THF (200 mL) și se concentrează până la 2-3 volume. Se repetă de încă două ori. Se încarcă N-(4-cloro-5-formiltiazol-2-il)acetamidă (1,22 g, 5,96 mmol, preparat mai sus în Metoda B) și DMF (12 mL). Se încălzește până la 110°C și se agită timp de 12 ore. Se răcește amestecul de reacție până la 25°C. Se adaugă 2-metiltetrahidrofuran (40 mL) și apă (40 mL). Straturile sunt separate și stratul apos a fost extras cu 2-metiltetrahidrofuran (40 mL). Straturile au fost separate și straturile organice combinate au fost spălate cu apă (20 mL).

Straturile au fost separate și stratul organic a fost concentrat. Se adaugă acetat de etil (20 mL) și apă (5 mL). Straturile au fost separate și stratul organic concentrat pentru a îndepărta solventul. Se adaugă acetat de etil (2mL) și heptan (2 mL) și se filtrează. Solidul filtrat este uscat sub vid la 55°C timp de 18 ore pentru a da compusul din titlu ca 93% amestec cu N-(4-cloro-5-formyliazol-2-il)acetamidă.

Preparare 3

Sinteză de (2S,4S)-4-hidroxi-2-metil-1-piperidin-1-carboxilat de terț-butil.

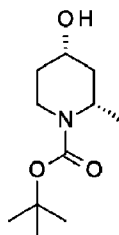
10



La un flacon se adaugă (2S)-2-metil-4-oxo-piperidin-1-carboxilat de terț-butil (50 g, 234,44 mmol) și tetrahidrofuran (500 mL). Amestecul este răcit la -65°C sub o atmosferă de azot și se adaugă tri(sec-butil)borohidruură de litiu (304,77 mL, 304,77 mmol; 1 M în tetrahidrofuran) în picătură peste 45 minute, menținând o temperatură internă sub -60°C. Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei timp de 1 oră, apoi este răcit la -30°C. La amestecul de reacție se adaugă un amestec de apă (25,34 mL) și tetrahidrofuran (100,16 mL), menținând o temperatură internă sub -20°C. Se adaugă o soluție apoasă de peroxid de hidrogen (118,88 mL, 1,17 mol, 30 g/g%) în apă (126,70 mL) în picătură într-o oră, menținând o temperatură internă sub 10°C. La amestec se adaugă soluție apoasă de acid clorhidric (46,89 mL, 234,44 mmol, 5 M) și metil t-butil eter (1,00 L) și amestecul este încălzit la temperatura camerei. Straturile sunt separate și faza organică este agitată cu o soluție de metabisulfid de sodiu (222,84 g, 1,17 mol) în apă (500 mL) timp de 10 minute la temperatura camerei. Straturile sunt separate și faza organică este uscată pe sulfat de magneziu și concentrată. Reziduu este purificat prin cromatografie rapidă (0-50 % metil t-butil eter /isohexan, gel de siliciu) și fracțiunile care conțin produsul sunt combinate și concentrate pentru a da compusul din titlu (40,4 g, 78%). ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

Sinteză alternativă de (2S,4S)-4-hidroxi-2-metil-1-piperidin-1-carboxilat de terț-butil.

30

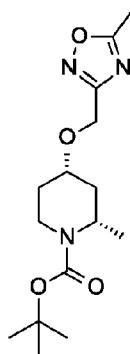


La un reactor căptușit cu sticlă conținând apă deionizată (460 L), și fosfat diacid de potasiu (6,5 kg, 0,41 echivalenți) la 20°C este încărcat DMSO (27,4 kg, 1,0 vol) și monohidrat de D-(+)-glucoză (28,9 kg, 1,25 echiv). Temperatura internă este ajustată până la 30°C, și pH-ul reacției este ajustat până la 6,9 prin adăugarea de hidroxid de sodiu apos (8%, 15 L, 0,28 echivalenți). Reactorul este încărcat cu (2S)-2-metil-4-oxo-piperidin-1-carboxilat de terț-butil (24,9 kg, 1,0 echivalenți (99,1%ee)), și amestecul este agitat la 30°C timp de 15 min. Ketoreductaza (KRED-130, 250 g, 1% g/g), glucoza dehidrogenază (GDH-101, 250 g, 1% g/g), și sarea de sodiu NADP (63 g, 0,25% g/g) sunt încărcate direct la amestecul de reacție printr-un port de deschidere. Amestecul este menținut la o temperatură de 30°C și pH 7,0± 0,2 prin adăugarea de 8% NaHCO₃ apoasă. După agitare timp de 16,5 ore (99,5% conversie), reacția este încărcată cu Celite™ (12,5 kg, 50 g/g%) și toluen (125 L, 5 vol). După agitare timp de 30 min la 30°C, amestecul este transferat la un alt reactor de 2000 L printr-un filtru GAF in linie (4 straturi) pe o perioadă de 1 oră. Amestecul este lăsat să stea 30 min fără agitare, straturile sunt separate, și stratul apos este reextras cu toluen (2 x 125 L). Straturile organice combinate sunt filtrate (filtru

GAF în linie), și amestecul de toluen este spălat cu soluție apoasă de clorură de sodiu (25%, 125 L, 5 vol) la 25°C. Soluția de toluen rezultată este uscată azeotropic (vid parțial, temperatură internă < 60°C) până la 0,10 g/g% apă, și răcită la 20°C. Amestecul este filtrat din reactor printr-un filtru cu cartuș în tamburi curați sub presiune pozitivă de azot. Amestecul de reacție este apoi transferat din
 5 tamburi într-un vas de sticlă aliniat de 500 L și concentrat sub vid (< 60°C) la un volum țintă rezidual de 56 L (2,25 vol). n-Heptanul (169 kg, 10 vol) este încărcat la 40°C, și amestecul este însământat cu 25 g de (2S,4S)-4-hidroxi-2-metil-piperidin-1-carboxilat de terț-butil. Suspensia groasă rezultată este diluată cu n-heptan suplimentar (25 L, 1 vol) și răcită la 16°C peste 4 ore. Produsul este izolat prin centrifugare, spălat cu n-heptan (25 L pe rotație; 4 rotații necesare),
 10 rezultând 20,3 kg (81%; >99,9% ee) după uscarea timp de 11 ore într-o tavă de uscare la 30°C. ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

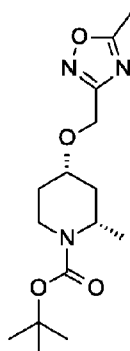
Preparare 4

Sinteză de (2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]piperidin-1-carboxilat de terț-butil.
 15



20 3-(Clorometil)-5-metil-1,2,4-oxadiazol (43,5 g, 301 mmol) se adaugă la o soluție de (2S,4S)-4-hidroxi-2-metil-piperidin-1-carboxilat de terț-butil (29,5 g, 137 mmol) în acetonitril (590 mL) la temperatura camerei. Amestecul de reacție este agitat într-o baie de apă cu gheață și se adaugă terț-butoxid de sodiu (54,3 g, 548 mmol) în porții peste 10 minute, menținând o temperatură internă sub 10°C. Amestecul de reacție este agitat într-o baie de apă cu gheață la o
 25 temperatură internă de 5°C timp de 9 ore, apoi este încălzit încet la temperatura camerei și este agitat peste noapte. Amestecul de reacție este răcit într-o baie de apă cu gheață și se adaugă soluție de clorură de amoniu apoasă saturată (200 mL) peste 5 minute, menținând o temperatură internă sub 10°C în timpul adăugării. Amestecul este apoi diluat cu apă (100 mL) și încălzit la temperatura camerei. Amestecul este extras cu metil terț-butil eter (2 × 300 mL) și organicele combinate sunt
 30 spălate cu saramură (300 mL). Organicele combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pentru a da un reziduu. Reziduu este trecut repede printr-un strat de gel de siliciu (300 g) eluând cu metil terț-butil eter (1 L) și filtratul este concentrat pentru a da compusul din titlu (46,5 g, 109%). MS m/z 334,0 (M+Na).

Sinteză alternativă de (2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]piperidin-1-carboxilat de terț-butil.
 35

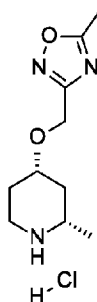


40

La o soluție de (2S,4S)-4-hidroxi-2-metil-piperidin-1-carboxilat de terț-butil (0,25g, 1,16 mmol) și 3-(clorometil)-5-metil-1,2,4-oxadiazol (0,308g, 2,32 mmol) în N,N-dimetilformamidă (3mL) sub azot la 0°C se adaugă în porții terț-butoxid de sodiu (0,35 g, 3,5mmol) peste 5 min. Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei timp de 10 min apoi la 40°C timp de 12 ore. Amestecul de reacție este răcit la temperatura camerei apoi stins cu apă (10mL). Straturile sunt separate și faza apoasă este extrasă cu metil terț-butil eter (2?10mL). Extractele organice combinate sunt spălate cu o soluție apoasă de clorură de litiu (5%), uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (0,49 g, 0,7 mmol, randament 81%, puritate 60%) ca ulei maro. MS m/z 334,0 (M+Na).

Preparare 5

Sinteză de clorhidrat de 5-metil-3-[[2S,4S)-2-metil-4-piperidil]oximetil]-1,2,4-oxadiazol.



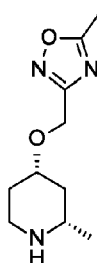
Un flacon conținând (2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]piperidin-1-carboxilat de terț-butil (4,03 g, 12,9 mmol) este scufundat într-o baie de apă cu gheață. La acest flacon se adaugă o soluție 4 M de acid clorhidric în 1,4-dioxan (25,9 mL, 104 mmol) în picătură peste 5 minute cu agitare, menținând o temperatură internă sub 20°C în timpul adăugării. Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei pentru 1 oră, apoi este concentrat pentru a da compusul din titlu (3,56 g, randament 92% pe baza purității de 83% măsurate prin ¹H RMN. MS m/z 212,0 (M+H).

Sinteză alternativă de 5-metil-3-[[2S,4S)-2-metil-4-piperidil]oximetil]-1,2,4-oxadiazol clorhidrat.

Se adaugă metanol (50 mL) la (2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]piperidin-1-carboxilat de terț-butil (12,9 g, 0,041 mol). Amestecul este răcit la 0°C. O soluție 4M de acid clorhidric în metanol (80 mL) se adaugă în picătură la amestecul răcit, menținând o temperatură internă sub 20°C. Amestecul de reacție este apoi agitat la temperatura camerei timp de 18 ore. Amestecul este apoi concentrat pentru a îndepărta solventul. Se adaugă acetonă (10 mL) și amestecul este agitat timp de 20 min. Se adaugă tetrahidrofuran (40 mL) și amestecul este agitat timp de 3 ore. Solidul este colectat prin filtrare sub azot și turta solidă filtrată este clătită cu tetrahidrofuran. Solidul filtrat este apoi uscat sub vid la 45°C timp de 2 ore pentru a da compusul din titlu cu puritate de 90%. Recristalizarea utilizând acetonă poate crește puritatea compusului din titlu până la 95%.

Preparare 6

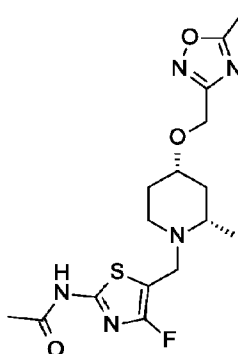
Sinteză de 5-metil-3-[[2S,4S)-2-metil-4-piperidil]oximetil]-1,2,4-oxadiazol.



La o soluție de (2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]piperidin-1-carboxilat de terț-butil (0,49g, 1,6 mmol) în diclorometan (10mL) sub azot se adaugă acid trifluoroacetic (1,8 mL, 23 mmol). Amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 3 ore. Amestecul este concentrat sub presiune redusă pentru a da un ulei galben. Reziduul este dizolvat în metanol (5mL) și turnat pe un cartuș cu schimbare de cationi, eluat cu metanol (2? 10mL) apoi cu o soluție de amoniac 2 M în metanol (10mL). Filtratul este concentrat sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (0,3g, 1,4 mmol, 91%). MS m/z 212,0 (M+H).

Exemplul 1

Sinteză de N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă.



N-(4-Fluoro-5-formil-tiazol-2-il)acetamida (28,3 g, 150 mmol) se adaugă la clorhidratul de 5-metil-3-[[[(2S,4S)-2-metil-4-piperidil]oximetil]-1,2,4-oxadiazol (48,7 g, 185 mmol, puritate 94%) în acetat de etil (707 mL) la temperatura camerei. Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei și se adaugă în picătură N,N-diizopropiletilamină (34,1 mL, 195 mmol) peste 1 minut, apoi se adaugă triacetoxiborohidruă de sodiu (98,5 g, 451 mmol) într-o porție. Amestecul de reacție este agitat într-un bloc de încălzire la 31°C peste noapte cu o temperatură internă de 30°C, apoi este răcit într-o baie de apă cu gheață la o temperatură internă de 5°C. La amestec se adaugă 2 M soluție de acid clorhidric apos (226 mL) peste 15 minute, menținând o temperatură internă sub 10°C. La amestec se adaugă apă (250 mL) și amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 5 minute. Straturile sunt separate și stratul organic este extras cu un amestec de 2 M soluție de acid clorhidric apos (28 mL) în apă (50 mL). Primul strat apos este agitat într-o baie de apă cu gheață și se adaugă o soluție apoasă 50% de hidroxid de sodiu (25,7 mL) în picătură peste 10 minute, menținând o temperatură internă sub 10°C. Amestecul este diluat cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (100 mL), apoi este agitat la temperatura camerei timp de 10 minute și apoi este extras cu acetat de etil (3 × 400 mL). Organicele combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pentru a da un reziduu. Al doilea strat apos din extragerea cu acid clorhidric apos este diluat cu 2-metiltetrahidrofuran (200 mL) și amestecul este trecut printr-un tampon scurt de pământ de diatomee. Filtratul este transferat la o pâlnie de separare și straturile sunt separate. Stratul apos este agitat într-o baie de apă cu gheață și se adaugă 50% dintr-o soluție apoasă de hidroxid de sodiu (3,15 mL) în picătură peste 5 minute, menținând o temperatură internă sub 10°C. Amestecul este diluat cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (10 mL), apoi este agitat la temperatura camerei timp de 5 minute și apoi este extras cu acetat de etil (3 × 40 mL) și 10% izopropanol în acetat de etil (100 mL). Organicele combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pentru a da un reziduu, care este combinat cu reziduul din prima parte din proces. Reziduul combinat este trecut printr-un strat de gel de siliciu (350 g) eluând cu acetat de etil (3,5 L) și filtratul este concentrat pentru a da un reziduu (45,8 g).

Reziduul (47,5 g de loturi combinate, 123,9 mmol) este purificat prin cromatografie rapidă, eluând cu 50-100% acetat de etil în heptan. Frațiunile care conțin produsul sunt concentrate la reziduu, care este suspendat într-un amestec 1:1 de metil-terț-butil eter și heptan (448 mL). Amestecul este agitat într-un bloc de încălzire la 46°C timp de 30 minute la o temperatură internă de 45°C, apoi este răcit la temperatura camerei în 2 ore cu agitare. Amestecul este filtrat, solidul spălat cu un amestec 1:1 de metil-terț-butil eter și heptan (30 mL). Solidul filtrat

este uscat sub vid la 40°C peste noapte pentru a da compusul din titlu (28,5 g). MS m/z 384,0 (M+H); $[\alpha]_D^{20} = +33,4^\circ$ (C=0,26, metanol).

Sinteză alternativă de N-[4-fluoro-5-[[2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

La o soluție de N-(4-fluoro-5-formil-tiazol-2-il)acetamidă (0,05g, 0,28 mmol) și 5-metil-3-[[2S,4S)-2-metil-4-piperidil]oximetil]-1,2,4-oxadiazol (0,04g, 0,19mmol) în diclorometan (10 mL) sub azot se adaugă N,N-diizopropiletilamină (0,1 mL, 0,57 mmol) și triacetoxiborohidruță de sodiu (0,12g, 0,57 mmol). Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei timp de 12 ore. Amestecul de reacție este turnat într-o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (10mL). Straturile sunt separate și faza apoasă este extrasă cu diclorometan (2×10mL). Extractele organice combinate sunt uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate sub presiune redusă pentru a da un ulei portocaliu.

Reziduul este preluat în metanol (la un volum total de 9,8 ml), filtrat și purificat prin prep-HPLC (Fenomenex Gemini-NX 10 Micron 50*150mm C-18) (CH₃CN & apă cu 10 mM bicarbonat de amoniu ajustat la pH 9 cu hidroxid de amoniu, 15 % până la 100% CH₃CN peste 10min la 110ml/min) (1 injecție) (271/204 nm) pentru a da compusul din titlu (0,02g, 0,05 mmol, 28%). MS m/z 384,2 (M+H).

Exemplul 1A

N-[4-fluoro-5-[[2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă cristalină.

Se suspendă N-[4-fluoro-5-[[2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamida brută (29,9g) în 448 mL de 50% metil terț butil eter în heptan la 46°C timp de 30 minute. Se agită amestecul și se răcește la 19°C peste două ore înainte de filtrare după care se spală cu 30 mL de 50% metil terț butil eter în heptan pentru a furniza compusul din titlu (28,5g, randament 95%).

Difracția cu raze X pe pulbere (XRPD) din Exemplul 1A

Tiparele XRPD ale solidului cristalin sunt obținute pe un difractometru cu raze X pe pulbere Bruker D4 Endeavor, echipat cu o sursă CuKα ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) și un detector Vantec, care operează la 35 kV și 50 mA. Mostră este scanată între 4 și 40° în 2θ, cu o etapă de dimensionare de 0,0087° în 2θ și o rată de scanare de 0,5 secunde/etapă, și cu divergență de 0,6 mm, antiîmprăștiere fixată la 5,28 mm, și fante detectoare de 9,5 mm. Pulberea uscată este ambalată pe un suport de cuarț pentru mostră și o suprafață netedă este obținută utilizând o lamelă din sticlă. Este bine cunoscut în domeniul cristalografiei că, pentru orice formă cristalină dată, intensitățile relative ale maximelor de difracție pot varia din cauza orientării preferate care rezultă din factori cum ar fi morfologia și comportarea cristalului. Unde sunt prezente efecte de orientare preferată, intensitățile maxime sunt alterate, dar pozițiile maxime caracteristice ale polimorfei sunt nemodificate. (vezi, de exemplu The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Capitolul 941 Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official 1 mai, 2015). Mai mult, este de asemenea bine cunoscut în domeniul cristalografiei că pentru orice formă cristalină dată pozițiile maximelor unghiulare pot varia puțin. De exemplu, pozițiile maxime se pot deplasa din cauza unei variații în temperatura sau umiditatea la care o mostră este analizată, în deplasarea mostrei, sau în prezența sau absența unui standard intern. În cazul prezent, o variabilitate a poziției maximului de ± 0,2 în 2θ va ține seama de aceste potențiale variații fără a stânjeni identificarea univocă a formei cristaline indicate. Confirmarea unei forme cristaline poate fi făcută pe baza oricărei combinații unice de maxime distinctive (în unități de °2θ), de obicei maximele mai proeminente. Tiparele de difracție ale formei cristaline, colectate la temperatura ambiantă și umiditate relativă, sunt ajustate pe baza maximelor standard NIST 675 la 8,85 și 26,77 grade 2-teta.

O mostră preparată de N-[4-fluoro-5-[[2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă cristalină este caracterizată printr-un tipar XRPD utilizând radiație CuKα ca având maxime de difracție (valori 2-teta) cum s-a descris în Tabelul 1 de mai jos. Tiparul specific conține un maxim la 12,1° în combinație cu unul sau mai multe maxime selectate din grupul constând din 15,3°, 21,6°, 22,2°, 22,7°, 23,5°, 24,3°, și 26,8° cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de 0,2 grade.

Tabelul 1: maximele de difracție cu raze X pe pulbere ale N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidei cristaline, Exemplul 1A.

Maxim	Unghi (2-teta°)+/- 0,2°	Intensitate relativă (% celor mai multe maxime intense)
1	7,7	9
2	10,1	9
3	12,1	100
4	15,3	50
5	18,3	11
6	19,3	13
7	21,6	16
8	22,2	16
9	22,7	16
10	23,5	30
11	24,3	35
12	26,8	27

5 **Test de enzimă OGA umană *in vitro*** **Generare de proteine OGA**

Secvența de nucleotide care codifică *O-GlcNAc-β-N-acetilglucosaminidase* (NM_012215) umană de lungime completă este inserată în vectorul pFastBac1 (Invitrogen) cu o etichetă poli-histidină (HIS) N-terminală. Generarea baculovirusului este efectuată în conformitate cu protocolul sistemului de expresie al baculovirusului Bac-la-Bac (Invitrogen). Celulele Sf9 sunt infectate la $1,5 \times 10^6$ celule/mL utilizând 10 mL de virus *PI* pe litru de cultură și incubate la 28°C timp de 48 de ore. Celulele sunt centrifugate, clătite cu PBS și granulele depozitate la -80°C. Proteinele OGA de mai sus (His-OGA) sunt purificate după cum urmează: 4 L de celule sunt lizate în 200 mL de tampon conținând 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM imidazol, 1 mM ditiotreit (DTT), 0,1% triton™ X-100, 4 tablete de inhibitori de protează (EDTA complete liber, Roche) timp de 45 min la 4°C. Acest lizat celular este apoi centrifugat timp de 40 min la 16500 rpm la 4°C, și supernatantul incubat cu 6 mL de rășină Ni-NTA (nichel-acid nitrilotriacetic) timp de 2 ore la 4°C.

Rășina este apoi ambalată pe coloană și spălată cu 50 mM tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM imidazol, 0,1% triton™ X-100, 1 mM DTT, urmată de 50 mM tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT. Proteinele sunt eluate cu 50 mM tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT. Frațiunile grupate care conțin His-OGA sunt concentrate până la 6 ml și încărcate pe Superdex75 (16/60). Proteina este eluată cu 50 mM tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM DTT. Frațiunile conținând His-OGA sunt grupate și concentrația de proteine măsurată cu BCA (test colorimetric Bradford).

Test de enzimă OGA

Enzima OGA catalizează la îndepărtarea *O-GlcNAc* de proteinele nucleocitoplasmice. Pentru a măsura această activitate, se utilizează fluoresceina di-N-acetil-β-N-acetil-D-glucozaminidă (*FD-GlcNAc*, Kim, Eun Ju; Kang, Dae Ook; Love, Dona C.; Hanover, John A. Carbohydrate Research (2006), 341(8), 971-982) ca substrat la o concentrație finală de 10 μM (în format de test cu 96 de godeuri) sau 6,7 μM (în format de test cu 384 de godeuri). Acest substrat fluorogenic devine fluorescent după clivarea cu OGA, astfel încât activitatea enzimei poate fi măsurată prin creșterea fluorescenței detectate la 535 nm (excitație la 485nm).

Tamponul de testare este preparat pentru a da o concentrație finală de 50 mM H₂NaPO₃-HNa₂PO₃, 0,01% albumină din ser bovin și 0,01% triton™ X-100 în apă, la pH 7. Concentrația finală a enzimei este 3 nM (în formatul de test cu 96 de godeuri) sau 3,24 nM (în formatul de test cu 384 de godeuri). Ambele formate de test dau în mod esențial rezultate echivalente.

Compușii care urmează să fie testați sunt diluați în dimetil sulfoxid (DMSO) pur utilizând curbe de răspuns la concentrație în zece puncte. Concentrația maximă a compusului în amestecul de reacție este 30 μM. Compușii la concentrația adecvată sunt preincubați cu enzima OGA timp de 30 minute înainte ca reacția să înceapă prin adăugarea substratului. Reacțiile sunt lăsate să se

desfășoare timp de 60 minute la temperatura camerei. Apoi, fără oprirea reacției, se citește fluorescența. Valorile IC₅₀ sunt calculate prin reprezentarea grafică a datelor normalizate vs. log compusului și ajustarea datelor utilizând o ecuație logistică cu patru parametri.

- 5 Compusul din Exemplul 1 a fost testat în mod esențial cum s-a descris mai sus și a prezentat o IC₅₀ de 2,36 nM± 0,786 (n=8). Aceste date demonstrează că compusul din Exemplul 1 inhibă activitatea enzimei OGA *in vitro*.

Testul întregii celule pentru măsurarea inhibării activității enzimei OGA

10

Placarea celulei:

- 15 Se utilizează condițiile standard cunoscute în domeniu, celulele TRex-293 modificate pentru expresia inductibilă a P301S-1N4R care formează proteina tau asociată microtubulelor, sunt generate și menținute în mediu de creștere, constând din DMEM bogat în glucoză (Sigma# D5796), suplimentat cu 10 % ser fetal bovin fără tetraciclină (FBS, Sigma F2442), 20 mM HEPES, 5 μg/mL blasticidină (Life Technologies# A11139-03) și 200 μg/mL zeocin (Life Technologies# R250-01). Pentru experimente, celulele sunt placcate în mediu de creștere la 10.000-14.000 celule pe godeu într-o placă cu 384 de godeuri Corning Biocoat (356663) acoperită cu poli-D-lizină, și incubate 20-24 ore într-un incubator celular la 37°C/5% CO₂. Experimentele sunt efectuate fără inducerea expresiei Tau.
- 20

Tratamentul compusului:

- 25 Compușii care urmează să fie testați sunt diluați serial 1/3 în DMSO pur utilizând curbe de răspuns la concentrație în zece puncte și sunt diluați în continuare în mediu de creștere. La 20-24 ore după placare, celulele sunt tratate cu compus de testat în mediu de creștere; concentrația maximă a compusului este 15 μM (0,15% DMSO). Inhibarea maximă este definită de măsurătorile replicate de 15 μM Tiamet G și inhibarea minimă este definită de măsurătorile replicate de tratament cu 0,15% DMSO. Celulele sunt întoarse în incubator la 37°C/5% CO₂ timp de 20-24 ore. Compuși sunt testați în duplicate în fiecare placă.
- 30

Imunocolorare:

- 35 După 20-24 ore de tratament al compusului, mediul este îndepărtat de pe placa de test și 25 μL de 3,7 % soluție de formaldehidă (Sigma # F1635) în DPBS (Sigma #D8537) se adaugă la fiecare godeu și se incubează timp de 30 minute. Celulele sunt apoi spălate o dată cu DPBS și apoi permeabilizate cu 0,1% triton™ X-100 (Sigma# T9284). După 30 minute, celulele sunt spălate de două ori cu DPBS și apoi se adaugă soluție de blocare (1% BSA/DPBS/0,1% triton™ X-100) la fiecare godeu și se incubează timp de 60 minute. Soluția de blocare este îndepărtată și se adaugă 0,40-0,33 μg/mL de soluție de anticorp proteic *O-GlcNAc* (clonă RL2, Thermo, MA1072) în soluție de blocare la celule și se lasă să stea peste noapte la 2-8°C. Următoarea zi, celulele sunt spălate de două ori cu DPBS și se adaugă anticorpul secundar, IgG anti-șoarece de capră Alexa Fluor 488 (Life Technologies # A11001) la 2 μg/mL în DPBS, la fiecare godeu și se lasă să stea la temperatura camerei timp de 90 min. Anticorpul secundar este îndepărtat, celulele spălate de două ori cu DPBS și o soluție de DAPI (Sigma #D9564) și RNază (Sigma, R6513) în DPBS la o concentrație de 1 și 50 μg/mL, respectiv, se adaugă la fiecare godeu. Placa este etanșată, incubată timp de o oră și analizată pe un Acumen eX3 hci (TTP Labtech). Toate incubările și etapele de spălare descrise mai sus sunt făcute la temperatura camerei, cu excepția anticorpului primar.
- 40
- 45

50

Analiză și rezultate:

- 55 Plăcile sunt analizate pe un instrument Acumen eX3 utilizând lasere de excitație de 488 și 405 nm și două filtre de emisie FL2 (500-530 nm) și FL1 (420-490 nm). Filtrul FL2 este semnalul corespunzător la anticorpul proteic *O-GlcNAc* (clonă RL2) și filtrul FL1 este semnalul corespunzător la nucleul celulei (DAPI). Raportul FL2 total/FL1 total (fluorescența totală a fiecărei godeu fără obiect sau selecție de populație) este utilizat pentru analiza datelor. Datele sunt normalizate la o inhibare maximă cum s-a referit printr-un tratament de 15 μM de Tiamet G și o inhibare minimă cum s-a obținut printr-un tratament cu 0,15% DMSO. Datele sunt ajustate cu o aplicație de ajustare pe o curbă neliniară (ecuație logistică cu 4 parametri) și valorile IC₅₀ sunt calculate și raportate.
- 60

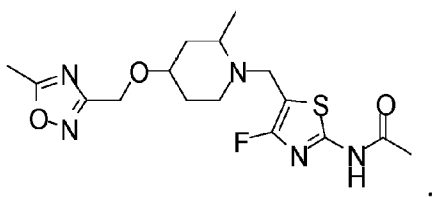
Compusul din Exemplul 1 a fost testat în mod esențial cum s-a descris mai sus și a prezentat o IC_{50} de $21,9 \text{ nM} \pm 7,3$ ($n=5$). Aceste date demonstrează că compusul din Exemplul 1 inhibă activitatea enzimei OGA într-un test celular.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2014/159234

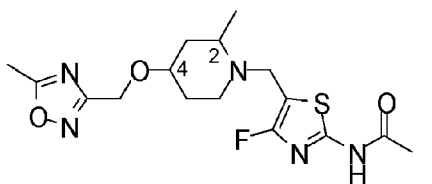
(57) Revendicări:

1. Un compus cu formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2. Compusul sau sarea în conformitate cu revendicarea 1 în care metilul din poziția 2 este în configurație *cis* față de oxigenul din poziția 4 pe inelul de piperidină:



3. Compusul sau sarea în conformitate fie cu revendicarea 1 sau revendicarea 2 în care compusul este N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il]acetamidă.

4. Compusul în conformitate cu revendicarea 3 care este N-[4-fluoro-5-[[[(2S,4S)-2-metil-4-[(5-metil-1,2,4-oxadiazol-3-il)metoxi]-1-piperidil]metil]tiazol-2-il] acetamidă.

5. Compusul în conformitate cu revendicarea 4 în care compusul este cristalin.

6. Compusul în conformitate cu revendicarea 5 care este caracterizat printr-un maxim în spectrul de difracție cu raze X pe pulbere, la unghiul de difracție 2-teta de $12,1^\circ$ în combinație cu unul sau mai multe maxime selectate din grupul constând din $15,3^\circ$, $21,6^\circ$, $22,2^\circ$, $22,7^\circ$, $23,5^\circ$, $24,3^\circ$, și $26,8^\circ$, cu o toleranță pentru unghiurile de difracție de $0,2$ grade.

7. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 pentru utilizare în terapie.

8. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 pentru utilizare în tratamentul bolii Alzheimer.

9. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 pentru utilizare în tratarea progresului deprecierii cognitive ușoare cu boala Alzheimer.

10. Un compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 pentru utilizare în tratarea paraliziei supranucleare progresive.

11. O compoziție farmaceutică, cuprinzând un compus sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic.

12. Un procedeu pentru prepararea unei compoziții farmaceutice, cuprinzând amestecarea unui compus sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-6 cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic.