EXP 00 093679

396 A-
365

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAMAYO S.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica

Rodríguez Madrid & Asociados
NIT 830 038.010-1

PATENTES	PATENTS
MARCAS	TRADEMARKS
DERECHOS DE AUTOR	COPYRIGHTS
LICENCIAS DE USO	LICENSING
SOFTWARE	SOFTWARE PROTECTION
REGISTROS SANITARIOS	SANITARY PERMITS
NOMBRES DE DOMINIO	DOMAIN NAME

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion 00093679 00000001 Folios 582
Fecha (AMD) 2000-12-22 15 38 02
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLEMEN
Dependencia 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E S D

REF EXPEDIENTE No000-93679 de Diciembre 7 de 2000
PATENTE "INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATIA DEIABETICA

Estimados señores

Damos alcance al expediente citado en la referencia, para reivindicar Prioridad de la Pátente solicitada, con fundamento jurídico en lo establecido en el Artículo 12 de la Decisión 344 de la comisión del Acuerdo de Cartagena y el Articulo 4 Lit F del Decreto 117/94 referente a la fuente normativa de reciprocidad, esta se basa en

a - El artículo 4 del convenio de París, aprobado mediante Ley 178/94, declarado exequible por la Corte Constitucional en Sentencia del 18 de Enero/96

b - Ley 170/94 en la cual Colombia aprobó el Acuerdo por el que se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC) suscrito en Marrakech (Marruecos) el 15 de Abril de 1994, y sus Acuerdos multilaterales, los cuales incluyen los aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, mejor conocido como el Trip' Dicha Ley 170 de 1997 fue declarada exequible por la Corte Constitucional el 28 de Marzo de 1995

El Articulo 2, Ord 1, del Trip's establece que la propiedad en el Mundo será reconocida, que los países miembros cumpliran los artículos1 a 12 y el Artículo 19 del convenio de paris A su vez, el artículo 4 del Convenio de París (es decir, uno de los artículos de cumplimiento obligatorio bajo Trip's) establece que la prioridad sobre la primera solicitud en el mundo será reconocida

Por lo tanto anexamos

Transversal 6a. No. 27-10 "Edificio Antares - Port House * Telefax 283 09 42 * Tels. 336 72 84 - 341 7003
e-mail:rodrimas@andinet.com * Santafé de Bogotá, D.C.

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAMAYO B.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica

Rodríguez Madrid & Asociados
NIT 830.038.010-1

PATENTES	PATENTS
MARCAS	TRADEMARKS
DERECHOS DE AUTOR	COPYRIGHTS
LICENCIAS DE USO	LICENSING
SOFTWARE	SOFTWARE PROTECTION
REGISTROS SANITARIOS	SANITARY PERMITS
NOMBRES DE DOMINIO	DOMAIN NAME

1 - Copia de las Prioridad **No.60/169.635** de Diciembre 8 de 1999 y la No **60/175.399** de Enero 11 de 2000 Debidamente Legalizadas por el Ministerio de Relaciones Exteriores

2 - Traducciones de las reivindicaciones de la **primera y segunda** solicitudes de Patentes efectuadas por Traductor Oficial avaladas por el Ministerio de Relaciones Exteriores

En consecuencia, ruego a ustedes una vez finquitada esta diligencia, ordenar lo pertinente para que el expediente siga su curso normal

Atentamente,

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
C C No 3'792'584-Cartagena
T.P No 59 363 del C S J

Anexo - Lo anunciado

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

3378 3

367

Miami, 31 Octubre 2000 AUTENTICACION No 6865

El Cónsul General CERTIFICA que el(la) señor(a) KATHERINE HARRIS ***
que autoriza el documento adjunto, ejercia legalmente en la fecha allí expresada
las funciones de SECRETARIO ESTADO y que la firma y sello que aparecen
en el documento como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales
El Consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Por el Cónsul General,

CARMENZA JARAMILLO GUTIERREZ
CONSUL GENERAL

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

DERECHOS Timbre US$ 7.00
Fondo Rot US$ 15 00

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493962

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO ADJUNTO CORRESPONDE A LAS FUNCIONES DEL SUSCRITO

2001 DIC 15 A 10:04

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D C

A black and white copy of this document is not official

368 4

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2 has been signed by Felicia Artiles

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

ESTADO GENERAL DE COLOA

Certified

5. at Tallahassee, Florida

6. the Twenty-Fourth day of October, A.D., 2000

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2000-23181

9. Seal/Stamp.

GREAT SEAL OF THE STATE OF FLORIDA
IN GOD WE TRUST

10. Signature:

Katherine Harris
Secretary of State

DSDE 99 (1-99)

If photocopied or chemically altered, the word "VOID" will appear

"State of Florida" appears in small letters across the face of this 8½" X 11" document

This document contains an artificial watermark on REVERSE. Hold at 45° DO NOT ACCEPT UNLESS VIEWED.

3 Columbus 5

369

PA 301848

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

September 22, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111

APPLICATION NUMBER. ***60/169,635***
FILING DATE ***December 08, 1999***

FELICIA ARTILES
Notary Public - State of Florida
My Commission Expires Nov 7, 2003
Commission # CC884296

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

W MONTGOMERY
Certifying Officer

12-09-99

Please type a plus sign (+) inside this box → [+]

Docket Number	A0000191L1-01-MJA

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET (Large Entity)

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53 (c).

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Austin Stephen	Bryans	Dean Cottage, 3 W. Wickham Rd., Balsham CB1 6DZ, UK
Lain-Yen	Hu	4991 S. Ridgeside Circle, Ann Arbor, Michigan 48105
Susan M.	Hutson	1123 W. 4th St., Winston-Salem, North Carolina 27101
Kathryn Foley	Lalioux	417 Hilltop Rd., Hummelstown, PA 17036

☒ *Additional inventors are being named on page 2 attached hereto*

TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

CORRESPONDENCE ADDRESS

Direct all correspondence to:

☐ Customer Number [ ] → *Place Customer Number Bar Code Label here*

OR

☒ Firm or Individual Name	Michael J. Atkins				
Address	Warner-Lambert Company				
Address	2800 Plymouth Road				
City	Ann Arbor	State	Michigan	ZIP	48105
Country	U.S.A.	Telephone	(734) 622-6218	Fax	(734) 622-1853

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

☒ Specification	*Number of Pages*	84			
☒ Drawing(s)	*Number of Sheets*	5	☒ Other (specify)	13 Claims on 14 pages, Abstract on 1 Page	

METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT (check one)

☒ A check or money order is enclosed to cover the filing fees		FILING FEE AMOUNT
☐ The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number	22-0455	$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE Michael J Atkins DATE 12/8/99

TYPED or PRINTED NAME Michael J. Atkins REGISTRATION NO. *(if appropriate)* 35,431

TELEPHONE (734) 622-6218

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231

PTO/SB/16 (8-98)

12/08/99 JC813 U.S. PTO 60/169635 12/08/99

Express Mail No. EJ676053336US

60169635 120899

382
371

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET (Large Entity)

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (city and either State or Foreign Country)
Erich	Lluh	1428 Bradley Ave., Hummelstown, PA 17036
Michael Francis	Rafferty	3711 Rolling Ridge Court, Ann Arbor, Michigan 48105
Todd Robert	Ryder	621 N. Ashley Street, Ann Arbor, Michigan 48103
Ti-Zhi	Su	2510 Meade Court, Ann Arbor, Michigan 48104
Devin Franklin	Welty	2213 Placid Way, Ann Arbor, Michigan 48104

PATENT 12098999

Certificate of Mailing by Express Mail

I certify that this provisional patent application cover sheet, provisional patent application and fee is being deposited on Deborah P. Hoff with the U.S. Postal Service as "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. 1.10 and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

Signature of Person Mailing Correspondence

Linda A. Zerby

Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231

PTO/SB/16 (8-98)

Express Mail No EJ676053367US

383
372

A0000151L1-01MJA

60880271.SE5665105

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

384
373

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

BACKGROUND OF THE INVENTION

More than 14 million people in the United States have diabetes. All people with diabetes are at risk of retinal complications. However, people with type I, i.e., insulin-dependent, diabetes, face a greater risk of severe vision loss than people with type II, i e., non-insulin dependent, diabetes.

Initially, the high blood glucose level in diabetic people causes an increase in growth factors in their eyes. This condition is known as the "pre-diabetic retinopathy stage" and can lead to retinopathy, if not prophylactically treated.

Retinopathy will affect the majority of diabetic people to some extent during their lifetimes (Anonymous, MMWR 42(10) 191-195 (1993)) It is the leading cause of blindness in Americans of age 20 to 74 today and is expected to impair vision in approximately one-third of diabetic people in the United States. Each year in the United States, as many as 40,000 new cases of blindness occur among diabetic people (CDC, unpublished data, 1993). Diabetic people are 25 times more likely than the general population to become blind due to retinopathy

Diabetic retinopathy has two stages-a nonproliferative stage, which typically occurs first, and a proliferative stage. The nonproliferative stage, which is also referred to as "background diabetic retinopathy," is characterized by thickening of the basement membrane, loss of retinal pericytes, microvascular abnormalities, intraretinal microaneurysms, retinal hemorrhages (also known as "dot blot" hemorrhages), retinal edema, in particular diabetic macular edema, capillary closure associated with retinal ischemia or poor retinal perfusion (i.e., poor vessel development) and soft and hard exudates. The proliferative stage, which affects an estimated 700,000 Americans (Chen et al., J Miss. State Med. Assoc. 36(7) 201-208 (1995)), is characterized by neovascularization and fibrovascular growth (i e., scarring involving glial and fibrous elements) from the retina or optic nerve over the inner surface of the retina or disc or into the vitreous cavity

WO 96/27375 PCT/US96/02999

The proliferative stage can lead to rubeotic or neovascular glaucoma. Macular edema can occur in either stage and it, along with complications from retinal neovascularization, are the two major retinal problems that cause the diabetes-related vision loss.

While the pathological stages of diabetic retinopathy are well-described, the molecular events underlying diabetic retinopathy are poorly understood. This is due, in part, to the fact that the disease progresses over ten to thirty years, depending on a given individual.

Tight control of glycemia and hypertension and ophthalmic screening of diabetics appears beneficial in preventing the disease. Current treatment consists of regular observation by an ophthalmologist, laser photocoagulation and vitrectomy.

Macular edema threatening or involving the macular center is treated with focal macular photocoagulation. Small (50 mu in diameter), mild-intensity laser burns are targeted at areas of leakage in the macula (Murphy, Amer. Family Physician 51(4): 785-796 (1995)). If the macular edema persists, retreatment may be necessary.

Patients with severe to very severe nonproliferative retinopathy and patients, who are at high risk for proliferative retinopathy or who already have early or advanced proliferative retinopathy, are treated with scatter or panretinal photocoagulation. Panretinal photocoagulation involves 1,500-2,000 laser burns, which are 500 mu in diameter, in the midperipheral and peripheral portion of the retina (Murphy (1995), supra).

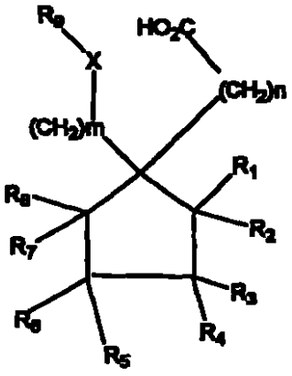
The best-documented biochemical mechanism for the development of microvascular complications of diabetes is the sorbitol pathway. In the sorbitol pathway, the enzyme aldose reductase catalyzes the conversion of glucose to sorbitol and galactose to galactitol. Aldose reductase has a low substrate affinity for glucose. Accordingly, when glucose concentrations are normal, the pathway is inactive. During hyperglycemia, the sorbitol pathway becomes active. Activation of the sorbitol pathway is important for retinal pericytes, for example, which do not require insulin for glucose penetration. Similarly, retinal capillary cells appear to contain substantial amounts of aldose reductase (Ferris, Hospital Practice: 79-89 (May 15, 1993)).

Given the prevalence of diabetic retinopathy, there remains a need for an effective prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy Accordingly, it is a principal object of the present invention to provide a method of prophylactically and therapeutically treating diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. This and other objects of the present invention will become apparent from the detailed description provided herein.

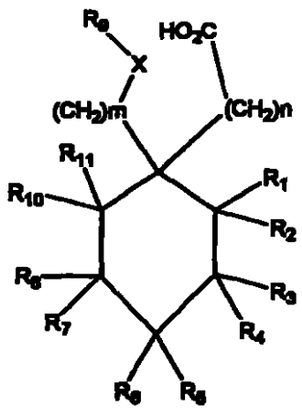
60560521 - 5E5605E05

SUMMARY OF THE INVENTION

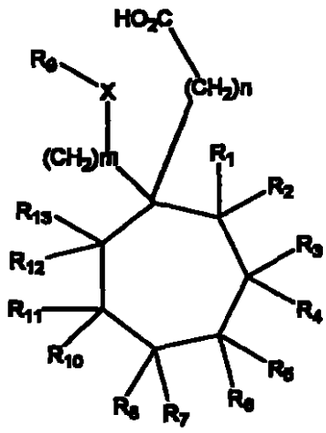
The present invention is directed to a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. The method involves the administration of an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway Preferably, the inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway is a compound of Formulas I, II, and/or III



I



II



III

wherein

R9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

$R_1 - R_8$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

X = NR_{14}, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof

Preferred compounds are those of Formula I, II, or III wherein m and n are 1, X is N_{R14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_6 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_8 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_8 are H, or R_2 is methyl.

More preferred compounds are those of Formula II wherein R_9 is alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_9 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_9 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

Especially preferred compounds are selected from:

(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,

EP1226126B1

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Benzylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Butylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylammomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylammo)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-ammo)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

1-Ammomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,

1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

394
380

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

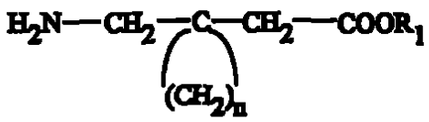
(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt; and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

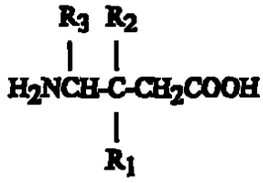
Several of the compounds described by Formulas I, II, and III are known. Compounds of Formula A.



A

wherein R_1 is hydrogen or a lower alkyl radical and n is 4, 5, or 6 are known in United States Patent Number 4,024,175 and its divisional United States Patent Number 4,087,544 The uses disclosed are: protective effect against cramp induced by thiosemicarbazide; protective action against cardiazole cramp, the cerebral diseases, epilepsy, faintness attacks, hypokinesia, and cranial traumas; and improvement in cerebral functions. The compounds are useful in geriatric patients. The patents are hereby incorporated by reference.

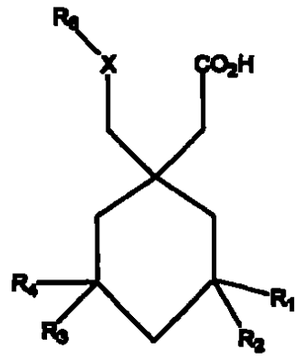
Compounds of Formula B



B

or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein R_1 is a straight or branched alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms, phenyl or cycloalkyl having from 3 to 6 carbon atoms, R_2 is hydrogen or methyl, and R_3 is hydrogen, or carboxyl are known in United States Patent Number 5,563,175 and its various divisionals. These patents are hereby incorporated by reference.

The present invention also discloses novel compounds of the Formula IV



IV

R_1-R_4 are hydrogen or alkyl,

X is NR_5 or O;

R_5 is hydrogen or alkyl,

R_6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R1-R4 are each hydrogen then R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof Like the comounds of Formulas I, II, and III, the compounds are useful for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage.

Preferred compounds are those of Formula IV wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are alkyl, R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is alkyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6, X is O, R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl.

Other preferred compounds are those of Formula IV wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6, R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy, and R_6 is allyl

Especially preferred compounds are selected from.

(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

6015955-120896

1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Butylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-(Isobutylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

WO 00/76958 PCT/US00/16027

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt; and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

The present invention is also a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of one or more compounds of Formula IV and a pharmaceutically acceptable carrier

Compounds of Formula II, such as gabapentin, are useful for treating various conditions such as neurodegenerative disorder (US 5,084,479), depression (US 5,025,035), anxiety/panic (US 5,792,796), mania/bipolar disorders (US 5,510,381), anti-inflammatory diseases (WO 98 158641), gastrointestinal damage (WO 99 108670), glaucoma, and pain. Because the compounds of Formula II and Formula IV both operate to affect the branch chain amino acid-dependent aminotransferase pathway and affect the synthesis of glutamate, which is involved in each of the aforementioned indications, the compounds of Formula IV will also

09602T-SEQLIST

be useful for the treating the indications. Thus, the present invention is also directed to the use of the compounds of Formula IV to treat each or more than one of neurodegenerative disorders (including but not limited to ALS, Parkinson's disease and Alzheimer's disease), depression, anxiety/panic, mania/bipolar disorders, anti-inflammatory diseases, glaucoma pain, or gastrointestinal damage.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 Scheme showing the BCAA shuttle in the retina. The shuttle proper is highlighted and shows how branched chain amino acids in the glia can transaminate α-ketoglutarate to form glutamate. The BCKA product diffuses across the interstitium (shown as grey) to the neurons where it is converted back to the branched chain amino acid by transamination with glutamate via BCATc. Abbreviations are as follows. BCAA=branched chain amino acid, GLU=glutamate; GLN=glutamine; Gln'ase=glutaminase; pyr=pyruvate; PC=pyruvate carboxylase, αKG=α-ketoglutarate, BCATm=mitochondrial branched chain aminotransferase; BCATc=cytosolic branched chain aminotransferase; BCKA=branched chain keto acid, GDH=glutamate dehydrogenase.

Figure 2. Effect of pyruvate concentration on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate plus glutamine (A) and pyruvate plus lactate (B) by *ex vivo* retinas. Hemi-retinas were incubated at 37°C under standard conditions with 25 mM $H^{14}CO_3$ for 20 minutes. Pyruvate in the medium was either 0.2 or 5 mM. Values shown are mean ± SEM (n=4, * $p<0.05$) Abbrevs. gln+glu = sum of labeled glutamine plus glutamate; pyr+lact = sum of labeled pyruvate plus lactate.

Figure 3. Expression of BCAT isoenzymes in rat retina. Tissue extraction, SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described using the ECL detection kit. Immunoaffinity purified rat anti-BCATc peptide antibody (1 1000) and human anti-BCATm antibody (1 1000) were used.

Figure 4. The influence of gabapentin (GBP) and branched chain amino acids on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate plus glutamine by *ex vivo* retinas. Half retinas were incubated at 37° C under standard conditions with 25 mM $H^{14}CO_3$ and 0 2 mM pyruvate for 20 minutes. In some instances gabapentin (1 mM) was included in the incubation medium and in others GBP (1 mM) plus all three branched amino acids (0 2 mM) each were included Values shown are means ± SEM of HCO_3 incorporated into glutamate plus glutamine in 20 minutes (n=4, * p<0 001, ** p<0 01). Abrevs. gln+glu = sum of labeled glutamine plus glutamate.

Figure 5. Influence of gabapentin (GBP) concentration on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate and glutamine in *ex vivo* retinas. Conditions were similar to those of Figure 4 except for the concentration of GBP Values shown are means ± SEM (n=6-7, * p<0 05). Abrevs. GLN+GLU = sum of glutamine plus glutamate; LACT + TCA = sum of lactate plus TCA cycle intermediates.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is predicated on the discovery that intraocular glutamate injection causes ganglion cell loss which is related to the early stages of diabetic retinopathy (Vorwerk et al. IOVS 37 1618-1624 (1996)) and that an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway, specifically gabapentin, is effective in inhibiting the synthesis of glutamate (see example below), thus preventing diabetic retinopathy Accordingly, the present invention provides a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. By "prophylactic" is meant the protection, in whole or in part, against diabetic retinopathy, in particular diabetic macular edema. By "therapeutic" is meant the amelioration of diabetic retinopathy, itself, and the protection, in whole or in part, against further diabetic retinopathy, in particular diabetic macular edema.

The method comprises the administration of an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway in an amount sufficient to treat the retina for retinopathy prophylactically or therapeutically Any inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway can be used in the method of the present invention as long as it is safe and efficacious. Herein, "branch chain amino acid-dependent aminotransferase (BCAT) inhibitor" will be used to refer to such compounds and is intended to encompass all compounds that affect the branch chain amino acid-dependent aminotransferase pathway at any and all points in the pathway

Preferably, the BCAT inhibitor is a compound of Formulas I, II, and/or III, as described above, or a pharmaceutically acceptable, BCAT pathway-inhibiting analogue or prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt, ester, or amide of any of the foregoing.

Unless otherwise expressly stated, the following definitions are adhered to throughout this disclosure.

"Alkyl" means a straight or branched hydrocarbon radical having from 1 to 10 carbon atoms (unless stated otherwise) and includes, for example, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sec-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-pentyl, isopentyl, n-hexyl, and the like. "Halogen" includes fluoro, chloro, bromo, and iodo.

"Alkenyl" means straight and branched hydrocarbon radicals having from 2 to 6 carbon atoms and one double bond and includes ethenyl, 3-buten-1-yl, 2-ethenylbutyl, 3-hexen-1-yl, and the like.

"Alkynyl" means straight and branched hydrocarbon radicals having from 2 to 6 carbon atoms and one triple bond and includes ethynyl, 3-butyn-1-yl, propynyl, 2-butyn-1-yl, 3-pentyn-1-yl, and the like.

"Cycloalkyl" means a monocyclic or polycyclic hydrocarbyl group such as cyclopropyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclodecyl, cyclobutyl, adamantyl, norpinanyl, decalinyl, norbornyl, cyclohexyl, and cyclopentyl Such groups can be substituted with groups such as hydroxy, keto, and the like. Also included are rings in which 1 to 3 heteroatoms replace carbons. Such groups are termed "heterocyclyl", which means a cycloalkyl group also bearing at least one heteroatom selected from O, S, or NR_2, examples being substituted or

unsubstituted oxiranyl, pyrrolidinyl, piperidyl, tetrahydropyran, piperazinyl, acylpiperazinyl, pyrrolidinyl, and morpholine.

"Alkoxy" refers to the alkyl groups mentioned above bound through oxygen, examples of which include methoxy, ethoxy, isopropoxy, tert-butoxy, and the like. In addition, alkoxy refers to polyethers such as $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$, and the like.

"Alkanoyl" groups are alkyl linked through a carbonyl, ie, C_1-C_5-C(O)- Such groups include formyl, acetyl, propionyl, butyryl, and isobutyryl

"Acyl" means an alkyl or aryl (Ar) group bonded through a carbonyl group, ie, R-C(O)- For example, acyl includes a C_1-C_6 alkanoyl, including substituted alkanoyl, wherein the alkyl portion can be substituted by NR^4R^5 or a carboxylic or heterocyclic group. Typical acyl groups include acetyl, benzoyl, and the like.

The alkyl, alkenyl, alkoxy, and alkynyl groups described above are optionally substituted, preferably by 1 to 3 groups selected from NR^4R^5, phenyl, substituted phenyl, thio C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, hydroxy, carboxy, C_1-C_6 alkoxycarbonyl, halo, nitrile, cycloalkyl, and a 5- or 6-membered carbocyclic ring or heterocyclic ring having 1 or 2 heteroatoms selected from nitrogen, substituted nitrogen, oxygen, and sulfur "Substituted nitrogen" means nitrogen bearing C_1-C_6 alkyl or $(CH_2)_nPh$ where n is 1, 2, or 3 Perhalo and polyhalo substitution is also embraced.

Examples of substituted alkyl groups include 2-aminoethyl, pentachloroethyl, trifluoromethyl, 2-diethylaminoethyl, 2-dimethylaminopropyl, ethoxycarbonylmethyl, 3-phenylbutyl, methanylsulfanylmethyl, methoxymethyl, 3-hydroxypentyl, 2-carboxybutyl, 4-chlorobutyl, 3-cyclopropylpropyl, pentafluoroethyl, 3-morpholinopropyl, piperazinylmethyl, and 2-(4-methylpiperazinyl)ethyl.

Examples of substituted alkynyl groups include 2-methoxyethynyl, 2-ethylsulfanylethynyl, 4-(1-piperazinyl)-3-(butynyl), 3-phenyl-5-hexynyl, 3-diethylamino-3-butynyl, 4-chloro-3-butynyl, 4-cyclobutyl-4-hexenyl, and the like.

09855121 - 120999

Typical substituted alkoxy groups include aminomethoxy, trifluoromethoxy, 2-diethylaminoethoxy, 2-ethoxycarbonylethoxy, 3-hydroxypropoxy, 6-carboxhexyloxy, and the like.

Further, examples of substituted alkyl, alkenyl, and alkynyl groups include dimethylaminomethyl, carboxymethyl, 4-dimethylamino-3-buten-1-yl, 5-ethylmethylamino-3-pentyn-1-yl, 4-morpholinobutyl, 4-tetrahydropyrimidylbutyl, 3-imidazolidin-1-ylpropyl, 4-tetrahydrothiazol-3-yl-butyl, phenylmethyl, 3-chlorophenylmethyl, and the like.

The terms "Ar" and "aryl" refer to unsubstituted and substituted aromatic groups. Heteroaryl groups have from 4 to 9 ring atoms, from 1 to 4 of which are independently selected from the group consisting of O, S, and N Preferred heteroaryl groups have 1 or 2 heteroatoms in a 5- or 6-membered aromatic ring. Mono and bicyclic aromatic ring systems are included in the definition of aryl and heteroaryl. Typical aryl and heteroaryl groups include phenyl, 3-chlorophenyl, 2,6-dibromophenyl, pyridyl, 3-methylpyridyl, benzothienyl, 2,4,6-tribromophenyl, 4-ethylbenzothienyl, furanyl, 3,4-diethylfuranyl, naphthyl, 4,7-dichloronaphthyl, pyrrole, pyrazole, imidazole, thiazole, and the like.

Preferred Ar groups are phenyl and phenyl substituted by 1, 2, or 3 groups independently selected from the group consisting of alkyl, alkoxy, thio, thioalkyl, hydroxy, -COOR^7, amino of the formula -NR^{4}R^5, and T(CH$_2$)$_m$QR^4 or T(CH$_2$)$_m$CO$_2$R^4 wherein m is 1 to 6, T is O, S, NR^4, N(O)R^4, NR^{4}R^{6}Y, or CR^{4}R^5, Q is O, S, NR^5, N(O)R^5, or NR^{5}R^{6}Y wherein R^4 and R^5 are as described above, and R^7 is alkyl or substituted alkyl, for example, methyl, trichloroethyl, diphenylmethyl, and the like. The alkyl and alkoxy groups can be substituted as defined above. For example, typical groups are carboxyalkyl, alkoxycarbonylalkyl, hydroxyalkyl, hydroxyalkoxy, and alkoxyalkyl.

The symbol "-" means a bond

The term "patient" means all animals including humans. Examples of patients include humans, cows, dogs, cats, goats, sheep, and pigs.

The compounds of the present invention can exist in unsolvated forms as well as solvated forms, including hydrated forms. In general, the solvated forms,

including hydrated forms, are equivalent to unsolvated forms and are intended to be encompassed within the scope of the present invention.

Certain of the compounds of the present invention possess one or more chiral centers and each center may exist in the R(D) or S(L) configuration. The present invention includes all enantiomeric and epimeric forms as well as the appropriate mixtures thereof.

The compounds of Formulas I, II, and III are capable of further forming both pharmaceutically acceptable formulations comprising salts, esters, amides, and prodrugs. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salts, esters, amides, and prodrugs" refers to those carboxylate salts, amino acid addition salts, esters, amides, and prodrugs of the compounds of the present invention which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio, and effective for their intended use, as well as the zwitterionic forms, where possible, of the compounds of the invention. The term "salts" refers to the relatively non-toxic, inorganic and organic acid addition salts of compounds of the present invention. These salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds or by separately reacting the purified compound in its free base form with a suitable organic or inorganic acid and isolating the salt thus formed and including, but not limited to, acid addition and/or base salts, solvents and N-oxides of a compound of Formulas I, II, and III. This invention also provides pharmaceutical formulations comprising a compound of Formulas I, II, or III together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient therefor. All of these forms are within the present invention.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts of the compounds of Formulas I, II and III include salts derived form inorganic acids such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydriodic, phosphorus, and the like, as well as the salts derived from organic acids, such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, alkanedioic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids, etc. Such salts thus include sulfate, pyrosulfate, bisulfate, sulfite, bisulfite, nitrate, phosphate, monohydrogenphosphate, dihydrogenphosphate,

metaphosphate, pyrophosphate, chloride, bromide, iodide, acetate, propionate, caprylate, isobutyrate, oxalate, malonate, succinate, suberate, sebacate, fumarate, maleate, mandelate, benzoate, chlorobenzoate, methylbenzoate, dinitrobenzoate, phthalate, benzenesulfonate, toluenesulfonate, phenylacetate, citrate, lactate, maleate, tartrate, methanesulfonate, and the like Also contemplated are the salts of amino acids such as arginate, gluconate, galacturonate, and the like, see, for example, Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," *J of Pharmaceutical Science*, 1977,66 1-19

The acid addition salts of the basic compounds are prepared by contacting the free base form with a sufficient amount of the desired acid to produce the salt in the conventional manner The free base form may be regenerated by contacting the salt form with a base and isolating the free base in the conventional manner The free base forms differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to their respective free base for purposes of the present invention.

Pharmaceutically acceptable base addition salts are formed with metals or amines, such as alkali and alkaline earth metal hydroxides, or of organic amines. Examples of metals used as cations are sodium, potassium, magnesium, calcium, and the like. Examples of suitable amines are N,N'-dibenzylethylenediamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, N-methylglucamine, and procaine; see, for example, Berge, et al., supra.

The base addition salts of acidic compounds are prepared by contacting the free acid form with a sufficient amount of the desired base to produce the salt in the conventional manner The free acid form may be regenerated by contacting the salt form with an acid and isolating the free acid in a conventional manner The free acid forms differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to their respective free acid for purposes of the present invention.

Examples of pharmaceutically acceptable, non-toxic esters of the compounds of this invention include C_1-C_6alkyl esters wherein the alkyl group is a straight or branched chain. Acceptable esters also include C_5-C_7cycloalkyl esters as well as arylalkyl esters such as, but not limited to benzyl. C_1-C_4alkyl

66802T 52566T05

esters are preferred Esters of the compounds of the present invention may be prepared according to conventional methods.

Examples of pharmaceutically acceptable, non-toxic amides of the compounds of this invention include amides derived from ammonia, primary C_1-C_6alkyl amines and secondary C_1-C_6dialkyl amines wherein the alkyl groups are straight or branched chain. In the case of secondary amines the amine may also be in the form of a 5- or 6-membered heterocycle containing one nitrogen atom. Amides derived from ammonia, C_1-C_3alkyl primary amines, and C_1-C_2dialkyl secondary amines are preferred. Amides of the compounds of the invention may be prepared according to conventional methods.

The term "prodrug" refers to compounds that are rapidly transformed *in vivo* to yield the parent compound of the above Formulae, for example, by hydrolysis in blood. A thorough discussion is provided in T Higuchi and V Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol 14 of the A.C.S Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed Edward B Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, both of which are incorporated herein by reference. In general, a prodrug is a drug which has been chemically modified and may be biologically inactive at its site of action, but which may be degraded or modified by one or more enzymatic or other in vivo processes to the parent bioactive form.

A therapeutically effective amount is an amount of a compound of Formulas I, II, or III, that when administered to a patient, ameliorates a symptom of the disease.

The BCAT inhibitor, which is preferably a compound of Formulas I, II, and/or III, a BCAT pathway-inhibiting analogue of Formulas I, II, and/or III, a BCAT pathway-inhibiting prodrug of Formulas I, II, and/or III, or a pharmaceutically acceptable salt of any of the foregoing, can be administered in accordance with the present inventive method by any suitable route. Suitable routes of administration include systemic, such as orally or by injection, topical, intraocular, periocular (e.g., subTenon's), subconjunctival, subretinal, suprachoroidal and retrobulbar The manner in which the BCAT inhibitor is administered is dependent, in part, upon whether the treatment of retinopathy is

prophylactic or therapeutic. The manner in which the BCAT inhibitor is administered for therapeutic treatment of retinopathy is dependent, in part, upon the cause of the retinopathy

For example, given that diabetes is the leading cause of retinopathy, the BCAT inhibitor can be administered prophylactically as soon as the pre-diabetic retinopathy state is detected For the prophylactic treatment of retinopathy that can result from diabetes, the BCAT inhibitor is preferably administered systemically, e.g., orally or by injection. For the therapeutic treatment of nonproliferative diabetic retinopathy, the BCAT inhibitor can be administered systemically, e.g., orally or by injection, or intraocularly Proliferative diabetic retinopathy can be therapeutically treated by the administration of the BCAT inhibitor intraocularly, topically, subconjunctivally or periocularly (e.g., subTenon's), for example. The BCAT inhibitor is preferably administered intraocularly, topically, subconjunctivally or periocularly (e.g., subTenon's) for the prophylactic or therapeutic treatment of retinopathy before, during or after surgical removal from an eye of scar tissue generated during neovascularization during the proliferative diabetic stage.

The BCAT inhibitor is preferably administered as soon as possible after it has been determined that an animal, such as a mammal, specifically a human, is at risk for retinopathy (prophylactic treatment) or has begun to develop retinopathy (therapeutic treatment) Treatment will depend, in part, upon the particular BCAT inhibitor used, the amount of the BCAT inhibitor administered, the route of administration, and the cause and extent, if any, of retinopathy realized.

One skilled in the art will appreciate that suitable methods of administering a BCAT inhibitor, which is useful in the present inventive method, are available. Although more than one route can be used to administer a particular BCAT inhibitor, a particular route can provide a more immediate and more effective reaction than another route. Accordingly, the described routes of administration are merely exemplary and are in no way limiting.

The dose administered to an animal, particularly a human, in accordance with the present invention should be sufficient to effect the desired response in the animal over a reasonable time frame. One skilled in the art will recognize that dosage will depend upon a variety of factors, including the strength of the

09812559 071299

particular BCAT inhibitor employed, the age, species, condition or disease state, and body weight of the animal, as well as the amount of the retina about to be affected or actually affected by retinopathy The size of the dose also will be determined by the route, timing and frequency of administration as well as the existence, nature, and extent of any adverse side effects that might accompany the administration of a particular BCAT inhibitor and the desired physiological effect. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that various conditions or disease states, in particular, chronic conditions or disease states, may require prolonged treatment involving multiple administrations.

Suitable doses and dosage regimens can be determined by conventional range-finding techniques known to those of ordinary skill in the art. Generally, treatment is initiated with smaller dosages, which are less than the optimum dose of the compound. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. The present inventive method will typically involve the administration of from about 1 mg/kg/day to about 100 mg/kg/day, preferably from about 15 mg/kg/day to about 50 mg/kg/day, if administered systemically Intraocular administration typically will involve the administration of from about 0.1 mg total to about 5 mg total, preferably from about 0 5 mg total to about I mg total. A preferred concentration for topical administration is 100 mu M

Compositions for use in the present inventive method preferably comprise a pharmaceutically acceptable carrier and an amount of a BCAT inhibitor sufficient to treat retinopathy prophylactically or therapeutically The carrier can be any of those conventionally used and is limited only by chemico-physical considerations, such as solubility and lack of reactivity with the compound, and by the route of administration. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that, in addition to the following described pharmaceutical compositions, the BCAT inhibitor can be formulated as polymeric compositions, inclusion complexes, such as cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, microspheres, microcapsules and the like (see, e.g , U S Pat. Nos. *4,997,652*, *5,185,152* and *5,718,922*)

The BCAT inhibitor can be formulated as a pharmaceutically acceptable acid addition salt. Examples of pharmaceutically acceptable acid addition salts for

406
395
31

use in the pharmaceutical composition include those derived from mineral acids, such as hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, metaphosphoric, nitric and sulfuric acids, and organic acids, such as tartaric, acetic, citric, malic, lactic, fumaric, benzoic, glycolic, gluconic, succinic, and arylsulphonic, for example p-toluenesulphonic, acids.

The pharmaceutically acceptable excipients described herein, for example, vehicles, adjuvants, carriers or diluents, are well-known to those who are skilled in the art and are readily available to the public. It is preferred that the pharmaceutically acceptable carrier be one which is chemically inert to the BCAT inhibitor and one which has no detrimental side effects or toxicity under the conditions of use.

The choice of excipient will be determined in part by the particular BCAT inhibitor, as well as by the particular method used to administer the composition Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of the pharmaceutical composition of the present invention. The following formulations are merely exemplary and are in no way limiting.

Injectable formulations are among those that are preferred in accordance with the present inventive method. The requirements for effective pharmaceutically carriers for injectable compositions are well-known to those of ordinary skill in the art (see Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J B Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), and ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)). It is preferred that such injectable compositions be administered intramuscularly, intravenously, or intraperitoneally

Topical formulations are well-known to those of skill in the art. Such formulations are suitable in the context of the present invention for application to the skin. The use of patches, corneal shields (see, e.g., U S Pat. No *5,185,152*), and ophthalmic solutions (see, e.g., U S Pat. No *5,710,182*) and ointments, e.g., eye drops, is also within the skill in the art.

Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the compound dissolved in diluents, such as water, saline, or orange juice; (b) capsules, sachets, tablets, lozenges, and troches, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as solids

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

or granules, (c) powders, (d) suspensions in an appropriate liquid, and (e) suitable emulsions. Liquid formulations may include diluents, such as water and alcohols, for example, ethanol, benzyl alcohol, and the polyethylene alcohols, either with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, suspending agent, or emulsifying agent. Capsule forms can be of the ordinary hard- or soft-shelled gelatin type containing, for example, surfactants, lubricants, and inert fillers, such as lactose, sucrose, calcium phosphate, and corn starch. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, corn starch, potato starch, alginic acid, microcrystalline cellulose, acacia, gelatin, guar gum, colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, talc, magnesium stearate, calcium stearate, zinc stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, diluents, buffering agents, disintegrating agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, and pharmacologically compatible excipients. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, usually sucrose and acacia or tragacanth, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia, emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, such excipients as are known in the art.

The effectiveness of an orally administered drug is dependent upon the drug's efficient transport across the mucosal epithelium and its stability in entero-hepatic circulation. Drugs that are effective after parenteral administration but less effective orally, or whose plasma half-life is considered too short, may be chemically modified into a prodrug form.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. The inhibitor can be administered in a physiologically acceptable diluent in a pharmaceutical carrier, such as a sterile liquid or mixture of liquids, including water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, an alcohol, such as ethanol, isopropanol, or hexadecyl alcohol, glycols, such as propylene glycol or polyethylene glycol, dimethylsulfoxide, glycerol ketals, such as 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol, ethers, such as poly(ethyleneglycol) 400, an

60022-1235 - 1208099

408
397

oil, a fatty acid, a fatty acid ester or glyceride, or an acetylated fatty acid glyceride, with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, such as a soap or a detergent, suspending agent, such as pectin, carbomers, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or carboxymethylcellulose, or emulsifying agents and other pharmaceutical adjuvants. Oils, which can be used in parenteral formulations include petroleum, animal, vegetable, or synthetic oils. Specific examples of oils include peanut, soybean, sesame, cottonseed, corn, olive, petrolatum, and mineral.

Suitable fatty acids for use in parenteral formulations include oleic acid, stearic acid, and isostearic acid. Ethyl oleate and isopropyl myristate are examples of suitable fatty acid esters.

Suitable soaps for use in parenteral formulations include fatty alkali metals, ammonium, and triethanolamine salts, and suitable detergents include (a) cationic detergents such as, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, and alkyl pyridinium halides, (b) anionic detergents such as, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates, (c) nonionic detergents such as, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkanolamides, and polyoxyethylenepolypropylene copolymers, (d) amphoteric detergents such as, for example, alkyl-p-aminopropionates, and 2-alkyl-imidazoline quaternary ammonium salts, and (e) mixtures thereof.

The parenteral formulations will typically contain from about 0 5 to about 25% by weight of the active ingredient in solution. Preservatives and buffers may be used. In order to minimize or eliminate irritation at the site of injection, such compositions may contain one or more nonionic surfactants having a hydrophile-lipophile balance (HLB) of from about 12 to about 17

The quantity of surfactant in such formulations will typically range from about 5 to about 15% by weight. Suitable surfactants include polyethylene sorbitan fatty acid esters, such as sorbitan monooleate and the high molecular weight adducts of ethylene oxide with a hydrophobic base, formed by the condensation of propylene oxide with propylene glycol The parenteral formulations can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials, and can be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid excipient, for example, water, for

08827 5239705

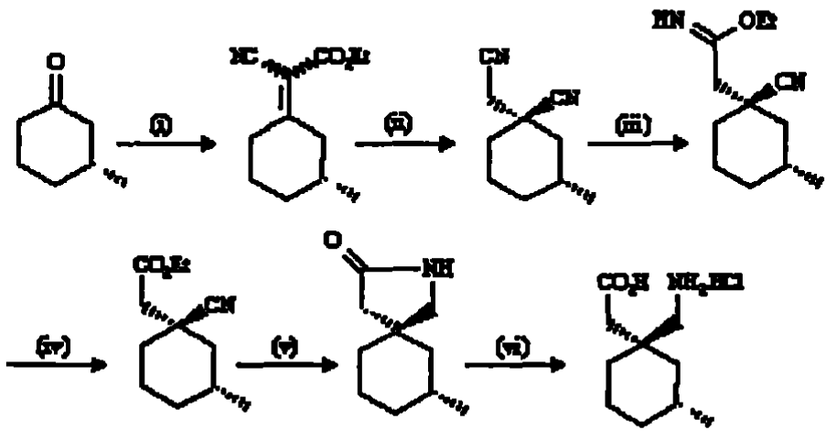
injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described

Such compositions can be formulated as intraocular formulations, sustained-release formulations or devices (see, e.g., U S Pat. No *5,378,475*). For example, gelantin, chondroitin sulfate, a polyphosphoester, such as bis-2-hydroxyethyl-terephthalate (BHET), or a polylactic-glycolic acid (in various proportions) can be used to formulate sustained-release formulations. Implants (see, e.g., U S Pat. Nos. *5,443,505*, *4,853,224* and *4,997,652*), devices (see, e.g , U S Pat. Nos. *5,554,187*, *4,863,457*, *5,098,443* and *5,725,493*), such as an implantable device, e.g., a mechanical reservoir, an intraocular device or an extraocular device with an intraocular conduit (e.g , 100 mu -1 mm in diameter), or an implant or a device comprised of a polymeric composition as described above, can be used

The present inventive method also can involve the co-administration of other pharmaceutically active compounds. By "co-administration" is meant administration before, concurrently with, e.g., in combination with the BCAT inhibitor in the same formulation or in separate formulations, or after administration of a BCAT inhibitor as described above. For example, corticosteroids, e.g., prednisone, methylprednisolone, dexamethasone, or triamcinalone acetinide, or noncorticosteroid anti-inflammatory compounds, such as ibuprofen or flubiproben, can be co-administered. Similarly, vitamins and minerals, e.g., zinc, anti-oxidants, e.g., carotenoids (such as a xanthophyll carotenoid like zeaxanthin or lutein), and micronutrients can be co-administered.

General synthetic schemes for preparing compounds of Formula I- IV

EXAMPLE 1 trans-(1R,3R)(1-Ammomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Toluene, 120°C
(ii) a. NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115°C, b HCl (g)
(iii) EtOH, HCl (g), Toluene
(iv) HCl, H_2O
(v) H_2, EtOH/NH_3, Raney Ni_2, 30-50°C
(vi) HCl, H_2O, 140°C

Step i: 2-Cyano-((R)-3-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester

A mixture of 3-(R)-Methylcyclohexanone (125mmol), Ethyl cyanoacetate (124mmol), Ammonium acetate (12.5mmol) and glacial Acetic acid (24mmmol) were refluxed with a Dean Stark trap for 24 Hours. The mixture was cooled and washed with H_2O The H_2O washes were extracted with Toluene. The Toluene extracts were combined with the original organic layer, dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated. The crude oil was purified by Kugelrohr distillation to give an oil. (Bpt oven temp 150-160°C). Yield 86%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1 01-1 05 (3H, m), 1 17-1 32 (1H, m), 1 35 (3H, t, J=7Hz), 1 42-2.30 (6H, m), 2.98 (1H, d, J=13Hz), 3 74 (1H, d, J=13Hz), 4 27 (2H, q, J=7Hz)

MS (CI) m/z: 208 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{17}NO_2$ Calc: C 69.54 H 8 27 N 6.76,
Found. C 69 44 H 8.22 N 6 76

Step ii: trans-(1R,3R)-1-Cyanomethyl-3-methyl-cyclohexanecarbonitrile

To a solution of NaCN (40mmol) in 6mL H_2O and 160mL Ethanol (95%) was added 2-Cyano-((R)-3-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (40mmol) After 22 Hours at reflux the cooled solution was filtered, the filtrate acidified with gaseous HCl and filtered again. The solvent was removed and the crude oil was purified by column chromatography to give a pale yellow crystalline solid. Yield 88%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0 90 (1H, m), 0 98 (3H, d, J=6Hz), 1 11 (1H, t, J=12Hz), 1 38 (1H, dt, J=4, 9Hz), 1 60-1 90 (4H, m), 2.07 (2H, m), 2.68 (2H, s)

MS (CI) m/z: 163 (MH^+)

Analysis: $C_{10}H_{14}N_2$ Calc: C 74 04 H 8 70 N 17.27
Found. C 74 05 H 8.71 N 17.25

Step iii: trans-2-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester

To a solution of trans-(1R,3R)-1-Cyanomethyl-3-methyl-cyclohexanecarbonitrile (6.2mmol) in 30mL Ethanol (absolute) was added 30 mL dried Toluene. The solution was chilled in ice whilst saturating with gaseous HCl. The stoppered solution was then left to stand at room temperature for 24 Hours. The solvent was removed and the solid residue was triturated with Diethyl Ether to obtain a ppt which was dried to give a white crystalline solid. Yield 50%.

Mp 118-120°C

^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ 0 8-0 89 (1H, m), 0 91 (3H, d, J=6.3Hz), 1 06-1 12 (1H, m), 1 24-1.35 (1H, m), 1 37 (3H, t, J=7Hz), 1 41-1 95 (6H, m), 3 02 (2H, s), 4 49 (2H, q, J=7Hz) MS (CI) m/z: 195 (MH^+)

Analysis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1 08M HCl Calc: C 58 19 H 8.58 N 11 31

Found. C 58 25 H 8.59 N 11.59

Step iv: trans-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester

trans-2-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester (1 1mmol) was dissolved in ice cold H_2O (40mL) and the pH adjusted with 1N HCl to pH 1 5 The solution was stirred at room temperature for 20 Hours. Ethylacetate was added (30mL) and the organic layer was washed with H_2O, dried and the solvent removed to leave a clear oil. Yield 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0 78-0 90 (1H, m), 0 93 (3H, d, J=6Hz), 0 97-1 00 (1H, m), 1.23-1.25 (1H, m), 1.29 (3H, t, J=7.2Hz), 1.59-1 80 (4H, m), 2.05-2.08 (2H, Br t), 2.54 (2H, s), 4 20 (2H, q, J=7.2Hz)

MS (CI) m/z: 210 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{19}NO_2$ Calc: C 68.87 H 9 15 N 6 69

Found. C 68.87 H 9 11 N 6.90

Step v: trans-(5R,7R)-7-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one

trans-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8.9mmol) was dissolved in NH_3/EtOH (7%, 40mL) along with prewashed Raney Nickel (H_2O followed by EtOH) in a 250mL Parr flask. The solution was hydrogenated at 30°C, 46psi for 24 Hours. The cooled solution was filtered through a pad of celite, washing with Ethyl acetate. The solvent was removed from the filtrate to leave a white solid. Yield 30%.

Mp 92-98°C

^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ· 0.75-0 82 (1H, m), 0 84 (3H, d, J=6.4Hz), 0 88-0 94 (1H, m), 1 14-1 19 (1H, m), 1 20-1 50 (2H, m), 1 50-1 63 (4H, m), 1 91 (2H, s), 3 03 (2H, s), 7 42 (1H, s)

MS (CI) m/z: 168 (MH^+)

Analysis $C_{10}H_{17}NO$	Calc.	C 71 81	H 10.25	N 8.37
	Found	C 71 80	H 10.29	N 8.31

Step vi: trans-((1R,3R)-1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride

trans-(5R,7R)-7-Methyl-2-aza-spiro[4 5]decan-3-one (2.17mmol) was dissolved in a solution of 10M HCl (5mL) and H_2O (5mL) and the mixture was refluxed at approx 140°C for 5 Hours. The cooled solution was diluted with 10 mL H_2O and 10 mL DCM and the aqueous layer was further washed with 2x15 mL DCM. The aqueous layer was then reduced to dryness to leave a white solid. Yield 76%.

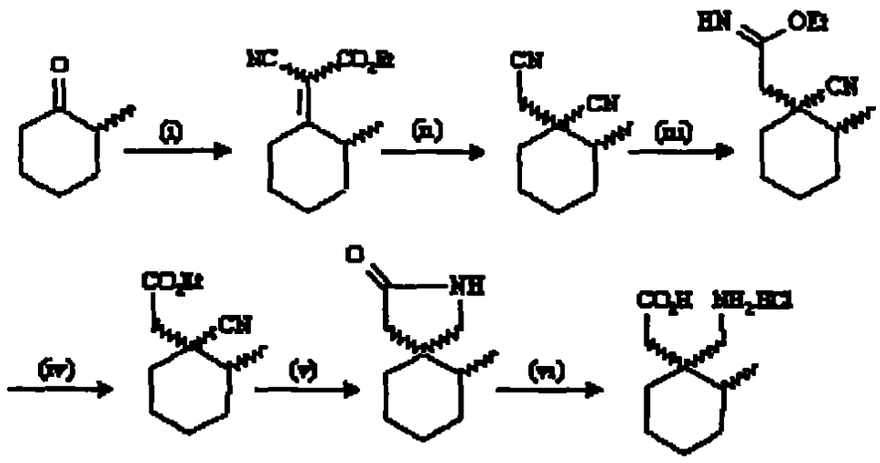
Mp 148-155°C. $[\alpha]_D$ = -2.5 (T=20°C, c=1, MeOH). One isomer (RR).

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0 69-0 79 (1H, m), 0.82 (3H, d, J=6Hz), 0 87-0 90 (1H, m), 1 12-1.20 (1H, dt, J=4.5, 13.3Hz), 1.34-1.50 (3H, m), 1 60-1 63 (3H, m), 2.30 (2H, s), 3 01 (2H, s), 7 93 (3H, Br s)

MS (CI) m/z: 186 (MH^+)

Analysis. $C_{10}H_{19}NO_2$ 1 1 HCl	Calc:	C 53.29	H 8.99	N 6 21
	Found	C 53.23	H 8.99	N 6 45

EXAMPLE 2. (1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Toluene, 120°C

(ii) a. NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115° C, b HCl (g)

(iii) EtOH, HCl (g), Toluene

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2 EtOH/NH_3 Raney Ni_2, 30-50°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Step i: 2-Cyano-(2-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester

(+/-) 2-Methyl cyclohexanone (80mmol), Ethyl cyanoacetate (80mmol), Ammonium acetate (8mmol) and glacial Acetic acid (16mmol) were reacted as in the General method (Example 1) step i to give a clear oil. Yield 76%.

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1.23 (3H, dd, J=7, 10Hz), 1.35 (3H, t, J=7Hz), 1.55-1.82 (5H, m), 1.93-2.05 (1H, m), 2.17 (1H, dt, J=5, 14Hz), 2.47 (1H, dt, J=5, 9Hz), 2.92-2.97 (1H, Br d, J=15Hz), 3.30-3.35 (1H, m), 3.81-3.86 (1H, Br d, J=15 Hz), 4.06-4.14 (1H, m), 4.23-4.30 (3H, dq, J=1, 6Hz)

MS (CI) m/z: 208 (MH+)

Analysis.	$C_{12}H_{17}NO_2$	Calc.	C 69.54	H 8.27	N 6.76
		Found	C 69.26	H 8.26	N 6.66

Step ii. 1-Cyanomethyl-2-methyl-cyclohexanecarbonitrile

2-Cyano-(2-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (37mmol), NaCN (37mmol) were reacted as in the General method (Example 1) step ii. The crude solid was purified by column chromatography (3 1, Heptane Ethylacetate), to give a clear oil. Yield 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1 06 (3H, d, J=6 8Hz), 1 11 (3H, d, J=6 8Hz), 1 20-2.20 (18H, m), 2 77 (2H, dd, J=16 8Hz), 2 63 (2H, dd, J=16 8Hz)
MS (CI) m/z. 163 (MH^+)

Analysis $C_{10}H_{14}N_2$ 0 1 H_2O	Calc:	C 73 49	H 8 69	N 16 86
	Found.	C 73.24	H 8 73	N 17 08

Step iii. 2-(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetimadic acid ethyl ester

1-Cyanomethyl-2-methyl-cyclohexanecarbonitrile(7.3mmol) was reacted as in the General method (Example 1) Step (iii) to give a white solid. Yield 70%.

Mpt 107-114°C.
^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ 1 00-1 06 (3H, 2xt, J=6.4Hz), 1 10-1.38 (2H, m), 1.38 (3H, t, J=6.8Hz), 1 40-2.10 (7H, m), 2.86, 2.92, 3 10, 3 28 (2H, 4xd, J=14,14 4, 14 8, 14Hz resp), 4 48 (2H, q, J=6.8Hz)
MS (CI) m/z 209 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{20}N_2$ O 1 06 HCl	Calc:	C 58.37	H 8 60	N 11 34
	Found.	C 58 15	H 8.63	N 11 60

Step iv- (1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester

2-(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester (4 1mmol) was reacted as in the General method (Example 1) step (iv) to give a clear oil. Yield 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1 03, 1 09 (3H, 2xd, J=7Hz), 1.27-1.30 (3H, m), 1 32-2.00 (8H, m) 2.10-2.20 (1H, m), 2.44, 2.82 (3H, 2xd, J=14 8Hz), 2.54 (1H, m), 4 16-4 22 (2H, m)

MS (CI) m/z: 210 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{19}NO_2$	Calc.	C 68 87	H 9 15	N 6 69
	Found.	C 68.84	H 9 13	N 6 75

Step v: 6-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one

(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8.4mmol) was reacted as in the General method (Example 1) Step (v) for 24 Hours at 10°C, 50 psi. The crude oil was purified by column chromatography (Ethylacetate), to give a white solid. Yield 34%

Mp: 85-90 °C

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0 88-0 91 (3H, dd, J=4, 6.8Hz), 1 41-1 78 (9H, m), 2 00-2.30 (2H, m), 3 06-3.23 (2H, m), 7.27 (1H, Br s)

MS (CI) m/z: 168 (MH^+)

Analysis. $C_{10}H_{17}NO$	Calc:	C 71 81	H 10.24	N 8.37
	Found.	C 71 83	H 10 19	N 8 27

Step vi (1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride

6-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one (2.5mmol) was reacted as in the General method (Example 1) step vi to give a white solid. Yield 42%.

Mp 108-110° C.

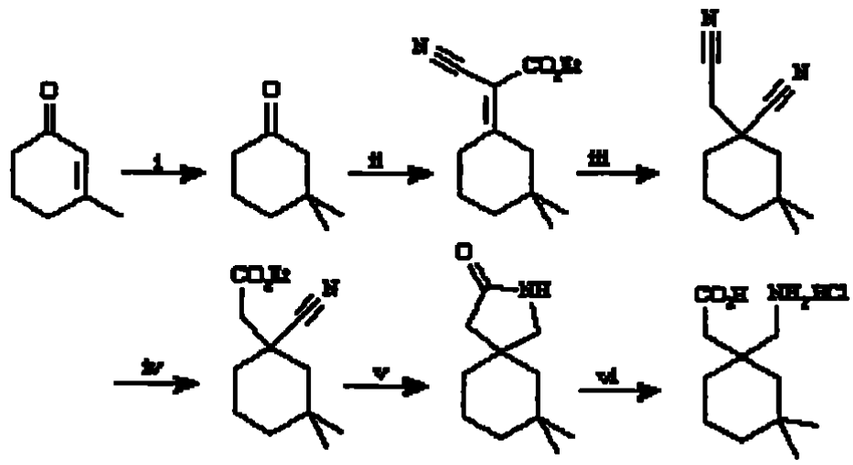
$[\alpha]_D$ = 0 (T=20 5° C, C=1, MeOH). Two Diastereomers 3 1

^{1}HNMR (DMSO + D_2O) 400MHz δ. 0 79, 0 85 (3H, 2xd, J=6.8Hz), 1.21-1 65 (9H, m), 2.22, 2.43 (1H, 2xd, J=15Hz), 2.46, 2.49 (1H, 2xd, J=15Hz), 2.83-2.92 (1H, 2xd, J=13 6Hz), 3 05, 3 15 (1H, 2xd, J=13 6Hz).

MS (Cl) m/z: 186 (MH^+)

Analysis $C_{10}H_{19}NO_2$ 1.3 HCl	Calc:	C 51 64	H 8 79 N 6.02
	Found	C 51 66	H 8 91 N 6.16

EXAMPLE 3 (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride (PD0167560-0002)



i) CeCl, MeLi, NH_4Cl, NH_3, (80%)
ii) $NCCH_2CO_2Et$; NH_4OAc; AcOH, toluene, (89%)
iii) NaCN, EtOH, H_2O, (57%)
iv) HCl, EtOH, toluene, (88%)
v) H_2, Raney Ni, EtOH, NH_3, (94%)
vi) HCl, H_2O, (69%)

Step i. 3,3-Dimethyl-cyclohexanone:

Synthesised via the method outlined by Pelletier, S W , Mody, N V., *J Org. Chem*, 1976, 41, 1069

A solution of lithium dimethyl cuprate was prepared by the addition of methyl lithium (1 4M in ether, 77.25mL, 2.45mol) to copper (I) iodide (8 8g, 0 046mol) under argon. The solution was cooled to 0°C, and 3-methyl-cyclohexen-1-one (5mL, 0 044mol) was added dropwise, with stirring, and a deep yellow precipitate was formed. The suspension was stirred at room temperature for one hour before being poured into a solution of aqueous ammonia (100mL) and ammonium acetate (ca. 5g). The layers were separated and the aqueous layer washed with diethyl ether (3x 50mL). The combined organics were washed with saturated brine (3x 100mL), dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo to leave a dark yellow liquid.

^{1}H NMR (400MHz. $CDCl_3$) 0 98 (6H, s), 1 59 (2H, m), 1 88 (2H, m), 2.14 (2H, m), 2.26 (2H, m).
IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2956, 1711 (C=O), 1457, 1368, 1292, 1226, 1076

Step ii. 2-Cyano-5,5-dimethyl-3-propyl-hex-2-enoic acid ethyl ester

To a solution of 3,3-dimethylcyclohexanone (4g, 0.032mol) in toluene (25mL) was added ethyl cyanoacetate (3.37mL, 0.032mol, 1 eq), ammonium acetate (0.24g, 0 003mol, 0 1eq.), and acetic acid (0 36mL, 0 006mol, 0.2eq). The yellow solution was heated to reflux whilst attached to a Dean-Stark trap, and heating was continued until no more water condensed in the trap. After cooling, the now orange solution was washed with water (3x 25mL) and the organic layer dried ($MgSO_4$). Filtration and removal of the solvent *in vacuo* gave the crude product as a deep orange liquid. Purification was achieved by Kugelrohr distillation to leave the mixture of *cis* and *trans* products as a pale yellow liquid, bp 160-170°C, 4 mbar (5 83g, 83%).

^{1}H NMR (400MHz. $CDCl_3$) 0 96 (6H, s, 2x Me), 0 99 (6H, s, 2x Me),1 34 (6H, m, 2x Me of ester), 1 49 (4H, m), 1 75 (2H, quin, *J* 6 4), 1 82 (2H, quin, *J* 6.4), 2.46 (2H, s), 2.60 (2H, t, *J* = 6 4 Hz), 2.80 (2H, s), 2.93 (2H, t, *J* = 6 4 Hz), 4.27 (4H, m)

MS (CI) z/e 222 (M^++1)

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2958, 2870, 2224 (CN), 1731 (C=O), 1606 (C=C), 1277, 1223

Analysis. $C_{13}H_{19}O_2N$	Calc:	C 70 56	H 8.65	N 6.32
	Found	C 70 35	H 8.79	N 6.25

Step iii: 1-Cyanomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile

To a solution of the 2-Cyano-5,5-dimethyl-3-propyl-hex-2-enoic acid ethyl ester (1.26g, 0 006mol) in ethanol (100ml) and water (4mL) was added sodium cyanide (0.28g, 0 006mol, 1 eq). The yellowish solution was heated to reflux for 8 hours and then cooled, during which time an off-white precipitate was formed.

The suspension was filtered under vacuum and the filtrate acidified with HCl gas until the pH was approximately 2. The mixture was then filtered a second time and then the solvent removed *in vacuo* to leave the crude product as a pale green solid.

Flash column chromatography, after adsorption of the crude product on to silica, eluting with 0-50% EtOAc in heptane gave the buntrile as a colourless solid (0 57g, 57%).

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0 99 (3H, s, Me), 1 13 (1H, td, *J* 13 2, 4.2), 1.21 (3H, s, Me), 1.32 (2H, m), 1 54 (1H, m), 1 82 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.65 (2H, s, CH_2CN)

^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 19 61, 25 17, 30 79, 31 18, 33 77, 34 79, 35.37, 37 92, 46.26, 115 06, 122.19

MS (CI) z/e 177 (M^++1)

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2988, 2937, 2869, 2237 (2x CN), 1749, 1456, 1423, 1369, 1202, 1180, 1031, 972.

Analysis. $C_{11}H_{16}N_2$	Calc:	C 74 96	H 9 15	N 15.89
	Found.	C 75 08	H 9 32	N 15 80

Step iv: (1-Cyano-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester

1-Cyanomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (0 50g, 2.84mmol) was dissolved in absolute ethanol (20mL) at room temperature and then cooled to 0°C.

Toluene (20mL) was added to the solution and then the reaction mixture was acidified by passing HCl gas through it at a gentle rate for *ca* 45 mins. The flask was then stoppered and left to stand at room temperature for 24 hours.

The yellow solution was partitioned between ethyl acetate and water and the layers separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3x 30mL), and the combined organics washed with aq sat. sodium hydrogen carbonate solution (3x 50mL), brine (3x 50mL), dried ($MgSO_4$), and the solvent removed under reduced pressure to leave a pale yellow liquid (0 59g, 93%).

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0.94 (3H, s, Me), 1 16 (3H,m), 1.21 (3H, s, Me), 1.29 (3H, t, *J* 7.2, CH_2CH_3), 1 50 (1H, m), 1 65 (1H, dt, *J* 14 4, 7 6), 1 84 (1H, qt, *J* 13.3, 3.2),1.96 (1H, dt, *J* 13 7, 2.2), 2.16 (1H, m), 2.48, (1H, d, *J* 15 6, C-2H), 2.54 (1H, d, *J* 15 6, C-2H), 4 20 (2H, q, *J* 7.2, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 14.21, 19 65, 25 42, 31 03, 34 04, 34 14, 36.08, 38 44, 46.14, 46.80, 61 02, 123 67, 169 00

MS (CI) *m/e* 224 (M^++1).

IR (film) ν_{max} cm^{-1} 2998, 2937, 2868, 2234 (CN), 1738 (C=O), 1457, 1372, 1217, 1181, 1154, 1026.

Analysis $C_{13}H_{21}NO_2$ Calc. C 69 92 H 9 48 N 6.27

Found. C 69 63 H 9 45 N 6.15

Step v 7,7-Dimethyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one:

(1-Cyano-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (0 5g, 2.23mmol) was hydrogenated in ethanolic ammonia (60mL) with Raney nickel as catalyst (*ca.* 0.25g) at 50°C and 50psi for 48 hours.

The catalyst was then removed by filtration through Celite, and the solvent removed *in vacuo* to leave a greenish crystalline solid.

Flash column chromatography, eluting with 0-100% ethyl acetate in heptane, gave the pure lactam as a colourless solid (340 mg, 84%).

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0 89 (3H, s, Me), 0 92 (3H, s, Me), 1.25 (2H, m), 1 36 (2H, m), 1.51 (3H, m), 1 68 (1H, s), 2.18 (1H, d, *J* 16 4, CH_2NH), 2.24 (1H, d, *J* 16 8, CH_2NH), 3 15 (2H, s, CH_2CO).

^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 19 16, 29 88, 30.36, 31.28, 36 57, 39 05, 39 61, 44 58, 49 54, 54 79, 177 72.

MS (CI) z/e 182 (M^++1)

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 3203, 3100 (NH), 2914, 2860, 1698 (C=O), 1486, 1374, 1317, 1289, 1257, 1076.

Analysis $C_{11}H_{19}NO$ Calc: C 72.88 H 10 56 N 7 73
Found C 72.38 H 10 47 N 7 56

Step vi (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride:

7,7-Dimethyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one (0.3g, 1 66mmol) was dissolved in a mixture of HCl (conc., 5mL) and water (5mL), and the resultant colourless solution heated to reflux for 20 hours. The solution was cooled and then partitioned between water and dichloromethane, and the layers separated. The aqueous layer was washed with dichloromethane (3x 20mL) and the water/HCl removed by rotary evaporation to leave the crude product as an off-white solid. Trituration of this solid with ethyl acetate and filtration of the product gave (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt as a colourless solid (140mg, 42%, 64% based on recovered starting material)

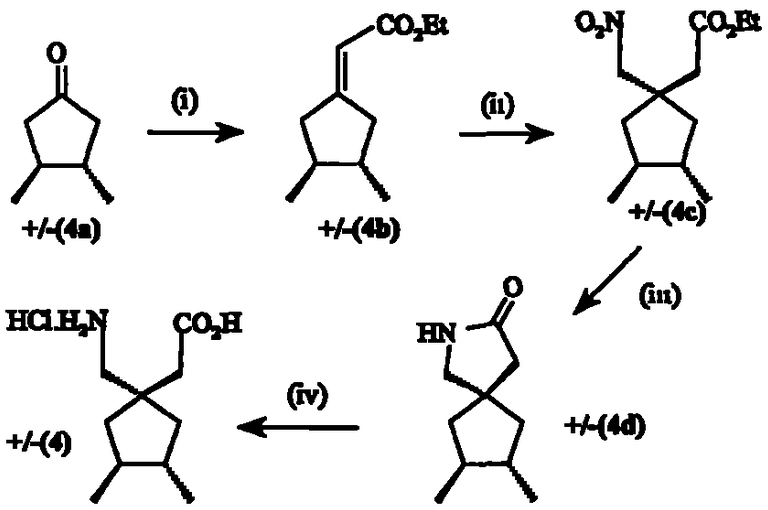
^{1}H NMR (400MHz, DMSO) 0.90 (3H, s, Me), 0 92 (3H, s, Me), 1 15-1 49 (8H, m), 2.45 (2H, s, CH_2CO_2H), 2.90 (2H, br.q, *J* 13 5, CH_2NH_3), 7 96 (3H, br.s, NH_3), 12.36 (1H, br s, OH).

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2930, 1728 (C=O), 1272, 1123

Analysis. $C_{11}H_{22}NO_2Cl$ Calc: C 56 04 H 9 41 N 5 94
Found. C 55 79 H 9 61 N 6.23

WO 99/21824 PCT/GB98/03159

EXAMPLE 4. (±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride



Reagents. (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$,$Bu_4N^+F^-$; (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Step 1. synthesis of (±) (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (4b)

NaH (60% dispersion in oil, 737 mg, 18.42 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (50 mL) and cooled to 0°C Triethylphosphonoacetate (3 83 mL, 19 30 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. The ketone (+/-)-(4a) (1 965 g, 17 54 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL) The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 3 01 g (94%) of (4b) as a colorless oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 01 (3H, d, J = 6 Hz), 1 03 (3H, d, J = 6 Hz), 1 26 (3H, t, J = 7 Hz), 1 49 (2H, m), 2 07 (1H, m), 2.24 (1H, m), 2 61 (1H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 72 (1H, s).
MS (CI+) m/e 183 (M+1)

Step u. synthesis of (±)(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (4c)

(±)(trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (4b) (2.95 g, 16 2 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (10 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (1 9 mL, 35.2 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 0 M in tetrahydrofuran, 22 mL, 22 0 mmol) After 6 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL), and washed with 2N HCl (30 mL) followed by brine (50 mL) The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate.heptane 1 9) to give 1 152 g (29%) of a clear oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$)· δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1 10-1.39 (5H, m), 1 47 (2H, m), 1 87 (1H, m), 2 03 (1H, m), 2 57 (2H, ABq, J = 16, 38 Hz), 4 14 (2H, q, J = 7 Hz), 4 61 (2H, ABq, J = 12, 60 Hz).
MS (ES+) m/e: 244 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956.

Step ui Synthesis of (±)-(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4.4]nonan-2-one (4d)

(±)(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (4c) (1 14 g, 4 7 mmol) was dissolved in methanol (50 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C. After 5 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo to give 746 mg (95%) of a pale yellow oil which solidified on standing

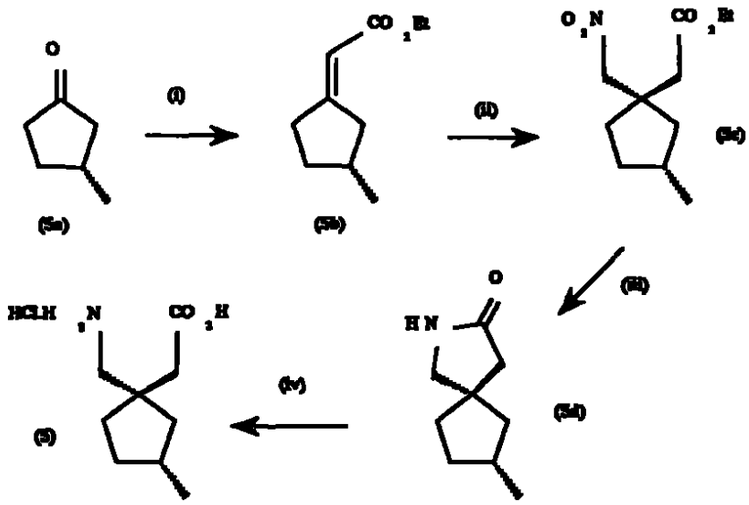
^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1.32 (2H, m), 1 46 (2H, m), 1 97 (2H, m), 2 27 (2H, ABq, J = 16, 27 Hz), 3 23 (2H, s), 5 62 (1H, br s)
MS (ES+) m/e 168 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1451, 1681, 1715, 2948, 3196

Step iv- Synthesis of (±)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (4)

(±)-(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4 4]nonan-2-one (4d) (734 mg, 4 40 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL) After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 x 30 mL) The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo. The residue was triturated with ethyl acetate to give 675 mg (69%) of a white solid after collection and drying.

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 91 (6H, d, J = 6 Hz), 1 18 (2H, m), 1 42 (2H, m), 1 72 (1H, m), 1 87 (1H, m), 2 42 (2H, ABq, J = 16, 24Hz), 2.90 (2H, ABq, J = 12, 34 Hz), 8 00 (3H, br s), 12 34 (1H, br s).
MS (ES+) m/e: 186 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 5 (cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (5)



Reagents (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Step i. Synthesis of (R)-(3-Methyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (5b)

NaH (60% dispersion in oil, 1.86 g, 46.5 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (40 mL) and cooled to 0°C. Triethylphosphonoacetate (9.69 mL, 48.8 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. (R)-3-Methyl-cyclopentanone (5a) (5 ml, 46.5 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL). The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1:9) to give 5.45 g (70%) of (2) as a colorless oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1.04 (3H, m), 1.27 (3H, t, J = 7 Hz), 1.80-2.74 (7H, m), 2.90-3.15 (1H, m), 4.13 (2H, q, J = 7 Hz), 5.76 (1H, s).
MS (CI+) m/e: 169 (M+1).
IR (film) ν cm^{-1} 1205, 1371, 1653, 1716, 2955

Step ii. Synthesis of (cis/trans)-(3R)-(3-Methyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (5c)

(R)-(3-Methyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (5b) (3 0 g, 17 8 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (1 92 mL, 35 6 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 0 M in tetrahydrofuran, 25 mL, 25 0 mmol) After 18 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL), and washed with 2N HCl (30 mL) followed by brine (50 mL) The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 2.00 g (49%) of a clear oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 02 (3H, d, J = 6 Hz), 1 08-1 37 (5H, m), 1 59-2.17 (5H, m), 2.64 (2H, m), 4 15 (2H, q, J = 7 Hz), 4.64 (2H, m)
MS (ES+) m/e: 230 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1183, 1377, 1548, 1732, 2956.

Step iii:Synthesis of (cis/trans)-(7R)-7-Methyl-spiro[4.4]nonan-2-one (5d)

(cis/trans)-(3R)-(3-Methyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (5c) (1 98 g, 8.66 mmol) was dissolved in methanol (50 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C After 18 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo and the residue purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate.heptane 1 1) to give 1 05 g (79%) of a white solid.
^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$)· δ 1 03 (3H, m), 1 22 (2H, m), 1 60-2.15 (5H, m), 2.22 (2H, m), 3.20 and 3 27 (2H total, 2 x s, cis, and trans), 6 18 (1H, br s).
MS (ES+) m/e. 154 (M+1).
IR (film) ν cm^{-1} 1695, 2949, 3231

Step iv· Synthesis of (cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (5)

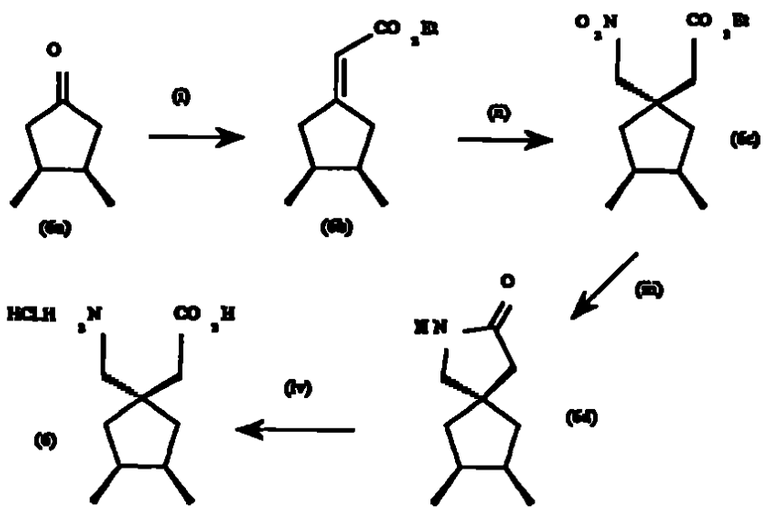
5015595 - 120898

(cis/trans)-(7R)-7-Methyl-spiro[4 4]nonan-2-one (5d) (746 mg, 4 88 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL) After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 x 30 mL). The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo The residue was triturated with ethyl acetate to give a white solid which was collected and dried Thus was recrystallized from ethyl acetate/methanol to give 656 mg (65%) of (5) after collection and drying.

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 96 (3H, m), 1 01-1 24 (2H, m), 1 42-2.10 (5H, m), 2.41 and 2.44 (2H total, 2 x s, cis/trans), 2 94 (2H, m), 7 96 (3H, br s), 12 35 (1H, br s).

MS (ES+) m/e 172 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 6 (+)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride



Reagents. (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Step i. Synthesis of (cis)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (6b)

NaH (60% dispersion in oil, 519 mg, 12.96 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (30 mL) and cooled to 0°C. Triethylphosphonoacetate (2.68 mL, 13.5 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. (3S,4R)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (6a) (1.21 g, 10.80 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL). The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 5:95) to give 1.40 g (71%) of (2) as a colorless oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0.84 (3H, d, J = 6 Hz), 0.91 (3H, d, J = 6 Hz), 1.26 (3H, t, J = 7 Hz), 2.01-2.95 (6H, m), 4.13 (2H, q, J = 7 Hz), 5.76 (1H, s).
MS (CI+) m/e: 183 (M+1).
IR (film) ν cm^{-1} 1043, 1125, 1200, 1658, 1715, 2959

Step ii. Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (6c)

(cis)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (6b) (1.384 g, 7.60 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (10 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (0.82 mL, 15.2 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1.0M in tetrahydrofuran, 11.4 mL, 11.4 mmol). After 6 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL) and washed with 2N HCl (30 mL) followed by brine (50 mL). The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 5:95) to give 0.837 g (45%) of a clear oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0.91 (6H, d, J = 6 Hz), 1.21-1.39 (5H, m), 1.98 (2H, m), 2.18 (2H, m), 2.64 (2H, s), 4.15 (2H, q, J = 7 Hz), 4.61 (2H, s).

MS (ES+) m/e: 244 (M+1).

IR (film) ν cm^{-1} 1184, 1377, 1548, 1732, 2961

Step m. Synthesis of (trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4.4]nonan-2-one (6d)

(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (6c) (0 83 g, 3 4 mmol) was dissolved in methanol (30 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C. After 4 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo to give 567 mg (99%) of a pale yellow oil which solidified on standing.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 89 (6H, d, J = 6 Hz), 1 38 (2H, m), 1 91 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.32 (2H,s), 3 18 (2H, s), 5 61 (1H, br s).

MS (ES+) m/e: 168 (M+1).

IR (film) ν cm^{-1} 1304, 1450, 1699, 2871, 3186

Step n. Synthesis of (trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (6)

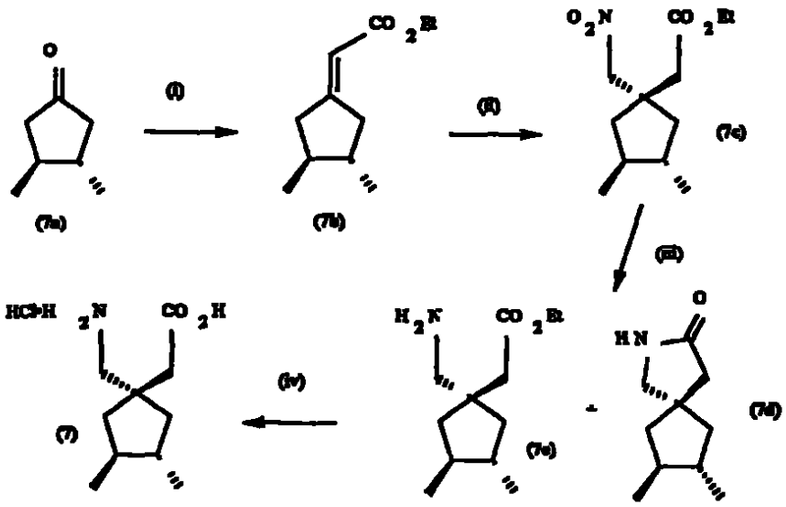
(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4 4]nonan-2-one (6d) (563 mg, 4 40 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL) After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 x 30 mL). The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo The residue was triturated with ethyl acetate to give a white solid which was collected and dried. This was recrystallized from ethyl acetate/methanol to give 440 mg (59%) of (6) after collection and drying.

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 84 (6H, d, J = 6 Hz), 1.21 (2H, m), 1 81 (2H, m), 2.06 (2H, m), 2.47 (2H, s), 2.89 (2H, s), 7 94 (3H, br s), 12 30 (1H, br s)

MS (ES+) m/e: 186 (M+1 for the free base).

02602274.2209999

EXAMPLE 7 (+)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride



Reagents. (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) Hcl.

(3S,4S)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (7a) is known in the literature and can be synthesized by the methods outlined therein. Y Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 1966;14 1438-1439 and related references. W C. M. C. Kokke, F A. Varkevisser, *J Org. Chem*, 1974;39 1535, R. Baker, D C. Billington, N Bransyake, *JCS Chem. Comm*, 1981 1234, K. Furuta, K. Iwanaga, H. Yamamoto, *Tet. Lett*, 1986;27 4507, G Solladie, O Lohse, *Tet. Asymm.*, 1993,4 1547, A. Rosenquist, I. Kvarnstrom, S C. T Svensson, B Classon, B Samuelsson, *Acta Chem. Scand*, 1992,46 1127, E. J Corey, W Su, *Tet. Lett*, 1988,29 3423, D W Knight, B Ojhara, *Tet. Lett.*, 1981;22 5101

Step i: Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (7b)

To a suspension of sodium hydride (1 3 g, 32.5 mmol) in THF (60 mL) under nitrogen at 0°C was added triethylphosphonoacetate (6.5 mL, 32.7 mmol)

over 5 minutes. After stirring for a further 10 minutes, a solution of (3S,4S)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (7a) (approx. 2.68 g, approx. 30 mmol) in THF (2 × 10 mL) was added to the now clear solution and the ice bath removed. After 4 hours the reaction was quenched by pouring into water (100 mL) and the mixture extracted with ether (400 mL). The organic phase was washed with saturated brine (100 mL), dried and concentrated in vacuo. Column chromatography (10 1 heptane/ethyl acetate) gave the product as an oil (4 53 g). (approx. 91% yield)

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 01 (3H, d, J = 6 Hz), 1 03 (3H, d, J = 6 Hz), 1 26 (3H, t, J = 7 Hz), 1 49 (2H, m), 2.07 (1H, m), 2.24 (1H, m), 2 61 (1H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 72 (1H, s)
MS (CI+) m/e: 183 (M+1).

Step ii. Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (7c)

To a solution of (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (7b) (4.24 g, 23.3 mmol) in THF (15 mL) was added TBAF (32 mL of a 1 M solution in THF, 32 mmol) followed by nitromethane (3 mL) and the reaction heated at 60°C for 8 hours. After cooling, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (150 mL) and washed with 2N HCl (40 mL) then saturated brine (50 mL). Column chromatography (10 1 heptane/ethyl acetate) gave the product as an oil (2.24 g). (40% yield)

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1 10-1.39 (5H, m), 1 47 (2H, m), 1 87 (1H, m), 2.03 (1H, m), 2.57 (2H, ABq, J = 16, 38 Hz), 4 14 (2H, q, J = 7 Hz), 4 61 (2H, ABq, J = 12, 60 Hz)
MS (ES+) m/e: 244 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

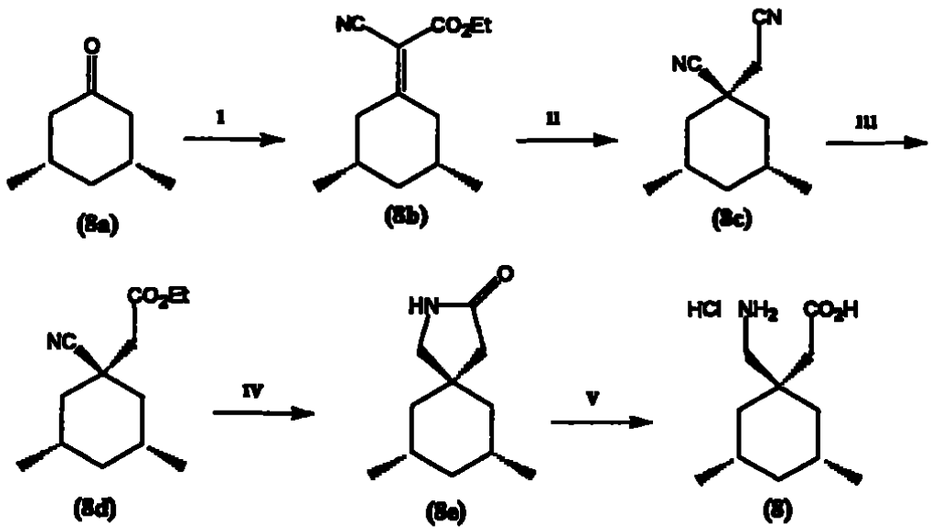
Step m. Synthesis of (+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (7)

A solution of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (7c) (3 5 g, 14 4 mmol) in methanol (100 mL) in the presence of Ni sponge was hydrogenated at 30°C and 50 psi for 4 hours. Filtering off the catalyst and concentrating in vacuo gave a 2 1 mixture of lactam and aminoester, 2.53 g, calculated as 96%, which was used without purification. This mixture (2 53 g, 13 8 mmol) in dioxane (15 mL) and 6N HCl (45 mL) was heated under reflux (oil bath = 110°C) for 4 hours. After cooling and diluting with water (60 mL), the mixture was washed with dichloromethane (3 × 50 mL) and then concentrated in vacuo The resulting oil was washed with ethyl acetate then dichloromethane to give a sticky foam which was dried to give the product as a white powder (2.32 g). (76% yield)

α_D (23°C) (H_2O) (c = 1 002) = +28.2°

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 91 (6H, d, J = 6 Hz), 1 18 (2H, m), 1 42 (2H, m), 1 72 (1H, m), 1 87 (1H, m), 2.42 (2H, ABq, J = 16, 24 Hz), 2 90 (2H, ABq, J = 12, 34 Hz), 8.00 (3H, br s), 12.34 (1H, br s).
MS (ES+) m/e: 186 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 8 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cycloheryl)-acetic acid hydrochloride



Step i. Synthesis of 2-Cyano-((3R,5S)-3,5-dimethyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (8b): Cis-3,5-dimethylcyclohexanone (8a, 15 78 g, 125 0 mmol) was dissolved in toluene (150 mL), and treated with ammonium acetate (0 96 g, 0 099 mmol), acetic acid (1 4 mL, 0 195 mmol), and ethyl cyanoacetate (14 04 g, 99 2 mmol) The reaction was heated to reflux overnight with a Dean-Stark trap, then cooled to room temperature and washed with H_2O (3 x 50 mL) The aqueous layer was backwashed with toluene (2 x 50 mL) The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4, and concentrated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with 5 % EtOAc/hexane to give 22.0 g (80%) of the desired product as a clear oil

MS 222 1 (M+1 for $C_{13}H_{19}N_1O_2$), an oil, TLC. SiO_2, R_f 0 40 (9 1 hexane/EtOAc);

Analysis ($C_{13}H_{19}N_1O_2$) (Cal.) C: 70 56, H 8 68, N 6 33 (found) C 70 74, H. 8 68, N 6.33 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 83-0 95 (m, 1 H), 1 01 (t, 6 H, J = 6 1 Hz), 1 32 (t, 3 H, J = 7 3 Hz), 1 48-1 85 (m, 5 H), 2.97-3 02 (m, 1 H), 3 92 (dd, 1 H, J = 12 2, 2 2 Hz), 4 24 (q, 2 H, J = 7 1 Hz)

434
423

Step ii. Synthesis of 1α,3β,5β-1-Cyanomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (8c): The 2-Cyano-((3R,5S)-3,5-dimethyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (8b, 6 64 g, 30 0 mmol) was dissolved in EtOH (60 mL) and added to a suspension of NaCN (1 47 g, 30 0 mmol) in EtOH / H_2O (100 mL / 8 mL). The reaction was heated to reflux overnight, then cooled to room temperature, filtered, and concentrated in vacuo to give a clear oil which solidified under vacuum. The residue was chromatographed on silica gel eluting with 4 1 hexane/EtOAc to give 4 05 g (77%) of the desired product as a white, sticky solid.

MS no M+1 ion observed ($C_{11}H_{16}N_2$), an oil, TLC SiO_2, R_f 0.31 (4 1 hexane/EtOAc),
Analysis ($C_{11}H_{16}N_2$) (Cal.) C 74 96, H. 9 15, N 15 89 (found) C 74 81, H. 9.25, N 15 65 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 58 (dd, 1 H, J = 24 9, 12.2 Hz), 0 96 (d, 6 H, J = 6 6 Hz), 1 03 (t, 2 H, J = 12.9 Hz), 1 75-1 90 (m, 3 H), 2.01 (d, 2 H, J = 11 5 Hz), 2.65 (s, 2 H)

Step iii. Synthesis of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride (PD0178554-0002) (8d) 1α,3β,5β-1-Cyanomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (8c, 5 51 g, 31.26 mmol) was dissolved in EtOH (80 mL) and toluene (80 mL), cooled to 0 °C, and saturated with HCl gas. The solution was stoppered and stirred overnight at room temperature, then concentrated in vacuo to give the crude imino ester as a white solid This crude material was triturated with Et_2O (150 mL) and dried under vacuum, then treated with H_2O (100 mL) and 1 N HCl (4 mL) The reaction was stirred overnight at room temperature, then extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4, and concentrated. The

EXHIBIT - 2250525

residue was chromatographed on silica gel eluting with 6 1 hexane/EtOAc to give 5 78 g (83%) of the desired product as a clear oil.

MS 224 1 (M+1 for $C_{13}H_{21}N_1O_2$), an oil, TLC. SiO_2, R_f 0 32 (6 1 hexane/EtOAc),
Analysis ($C_{13}H_{21}N_1O_2$) (Cal.) C 69 92, H 9 48, N 6 27 (found) C 70 03, H 9 45, N 6.30 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 9, 12.0 Hz), 0 91 (d, 6 H, J = 6 6 Hz), 1 27 (t, 3 H, J = 7 1 Hz), 1 70-1 76 (m, 1 H), 1 80-1 90 (m, 2 H), 2.02 (d, 2 H, J = 12.9 Hz), 2.51 (s, 2 H), 4 18 (q, 2 H, J = 7 1 Hz)

Step iv: Synthesis of 5α,7β,9β-7,9-Dimethyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one (8e). 1α,3β,5β-(1-Cyano-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8d, 5 82 g, 26 1 mmol) was dissolved in MeOH (150 mL), treated with 10% Rh / 2% Pd/C (1 0 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 28 h. The reaction was filtered and concentrated in vacuo The residue was chromatographed on silica gel eluting with a gradient of 2.3 hexane/EtOAc, EtOAc, 5% MeOH/EtOAc to give 2.21 g (47%) of the desired product.

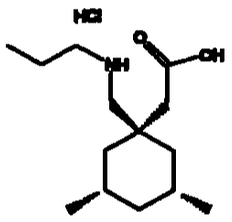
MS 182 0 (M+1 for $C_{11}H_{19}N_1O_1$), mp 116-118 °C, TLC SiO_2, R_f 0 36 (6% MeOH/CH_2Cl_2); Analysis ($C_{11}H_{19}N_1O_1$) (Cal.) C. 72 88, H. 10 56, N 7 73 (found) C 72.84, H. 10 67, N 7 63 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 49 (dd, 1 H, J = 24 4, 12 0 Hz), 0 86-0 93 (m, 8 H), 1 38-1 48 (m, 2 H), 1 60-1 71 (m, 3 H), 2.09 (s, 2 H), 3 16 (s, 2 H), 5 79 (br, 1 H).

Step v: Synthesis of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8) 5α,7β,9β-7,9-Dimethyl-2-aza-spiro[4 5]decan-3-one (8e, 0 52 g, 2.87 mmol) was treated with 6 N HCl (19 mL) and heated to reflux overnight. The reaction was cooled to room temperature, upon which a white precipitate formed. The solid was filtered away, and the filtrate was cooled to 0 °C to afford a second crop of crystals, then filtered again.

The solids were combined and dried under vacuum to give 0 46 g (68%) of the desired product.

MS 200 1 (M+1 for $C_{11}H_{21}N_1O_2$), mp 179-180 °C, Analysis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 56 04, H 9 41, N 5 94 (found) C. 56 16, H 9 42, N 5 73 ^{1}HNMR (CD_3OD) δ 0 46-0.53 (m, 1 H), 0 77 (t, 1 H, J = 12.5 Hz), 0 85-0 91 (m, 7 H), 1 55-1 67 (m, 5 H), 2.11 (d, 2 H, J = 13 4 Hz), 2.36 (s, 2 H), 2.44 (s, 1 H), 3 14 (s, 2 H)

EXAMPLE 9 1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt:

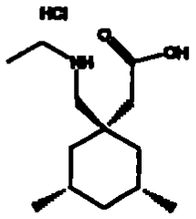


1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8, 1 0 g, 4.2 mmol) was dissolved in EtOH (100 mL), treated with sodium hydroxide solution (1 N, 5 mL), propionaldehyde (0 9 mL, 12.6 mmol), and 10 % Pd/C (0 3 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 3 h. The reaction was filtered, treated with HCl/Et_2O (1 M, 10 mL), and concentrated in vacuo The residue was treated with hot isopropanol (100 mL), the NaCl was filtered away, and the clear solution was concentrated in vacuo The crude product was recrystallized from i-PrOH/acetone/hexane (14 200 225 mL) and dried under vacuum to give 0 136 g (12%) of the desired product.

MS 242 1 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$), mp 178-180 °C, Analysis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$.HCl.0.27 H_2O) (Cal.) C 59 48, H 10 18, N 4 95 (found) C 59 53,

H. 10 21, N 4 78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 52 (dd, 1 H, J = 24 2, 12.0 Hz), 0 83-0 90 (m, 8 H), 1 00 (t, 3 H, J = 7 6 Hz), 1 61-1 80 (m, 7 H), 2 43 (s, 2 H), 2.98 (t, 2 H, J = 7 8 Hz), 3 20 (s, 2 H).

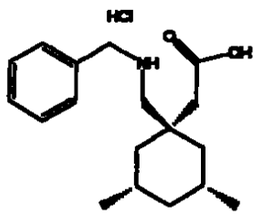
EXAMPLE 10 1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt



Example 10 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except that acetaldehyde was used instead of propionaldehyde and ethyl acetate/heptane was used for the recrystallization (30% yield).

MS 228 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$); mp 188-190 °C; ^{1}H NMR (DMSO) δ 0 83 (8H, br d), 1.24 (3 H, t, J = 7 1 Hz), 1 60 (6 H, m), 2 38 (d, s), 2 98 (2 H, m), 3 10 (2 H, br s), 8.33 (2 H, br s), 12.42 (1 H, br s).

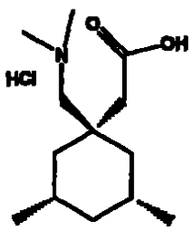
EXAMPLE 11 1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt:



Example 11 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except that benzaldehyde was used instead of propionaldehyde and Et_2O was used for the recrystallization (30% yield).

MS 290 1 (M+1 for $C_{18}H_{27}N_1O_2$), mp 162-163 °C, Analysis ($C_{18}H_{27}N_1O_2$.HCl.0.20H_2O) (Cal.) C. 65 62, H. 8.69, N 4 25 (found) C. 65 60, H. 8 71, N 4 31 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 48 (dd, 1 H, J = 12 5 Hz), 0 79-0 90 (m, 8 H), 1 46 (br, 2 H), 1 64 (d, 3 H, J = 13 4 Hz), 2 42 (s, 2 H), 3 19 (s, 2 H), 4.23 (s, 2 H), 7 43-7 50 (m, 5 H)

EXAMPLE 12 1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt:

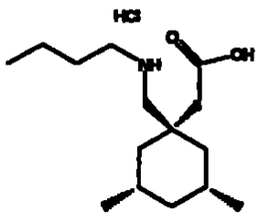


A solution of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8, 0.20 g, 0 59 mmol) in EtOH (15 mL), sodium hydroxide solution (1 N, 0 59 mmol), and H_2O (1 mL) was treated with 20% Pd/C (50 mg) and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 15 hours. The reaction was

filtered, treated with 1 N HCl/Et_2O (1 mL), and concentrated in vacuo The residue was dissolved in hot i-PrOH (4 mL), diluted with acetone (100 mL) and Et_2O (350 mL) and cooled to 0 °C The solid was filtered and dried under vacuum to give 103 mg (70% yield) of the desired product.

MS 228 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$), mp 195-196 °C, Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$.HCl.0 41H_2O) (Cal.) C 57 58, H. 9 97, N 5 16 (found) C. 57 73, H. 9 71, N 4 91 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 56 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.0 Hz), 0 89-0 92 (m, 8 H), 1 59-1 75 (m, 8 H), 2.51 (s, 2 H), 2.95 (s, 6 H), 3 44 (s, 2 H).

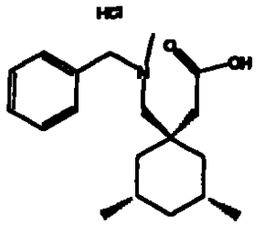
EXAMPLE 13 1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt



Example 13 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except butyraldehyde was used instead of propionaldehyde (48% yield).

MS 256 1 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$), mp 184-185 °C; Analysis ($C_{15}H_{29}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C- 61 73, H. 10.36, N 4 80 (found) C. 61 71, H 10 21, N 4 72. ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0.53 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.0 Hz), 0 86-0 99 (m, 11 H), 1.37-1 47 (m, 2 H), 1 60-1 75 (m, 7 H), 2.43 (s, 2 H), 3 02 (t, 2 H, J = 8 1 Hz), 3 20 (s, 2 H).

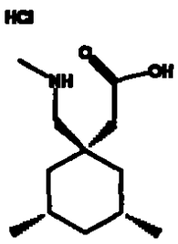
EXAMPLE 14 1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt



Example 14 was prepared in accordance with the method of Example 9, except that the N-benzyl analog (11) and formaldehyde were used as the starting material and PtO_2 was used as the catalyst instead of Pd/C (70% yield).

MS 304 1 (M+1 for $C_{19}H_{29}N_1O_2$), mp 209-210 °C; Analysis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$ HCl 0 21H_2O) (Cal.) C 66 40, H 8 92, N 4 08 (found) C 66 40, H 9 05, N 4 06 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 51 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.2 Hz), 0 79-0 92 (m, 9 H), 1 29 (br, 1 H), 1 56-1 82 (m, 4 H), 2.51 (dd, 2 H, J = 18 8, 16.3 Hz) 2.85 (s, 2 H), 3 23-3 49 (m, 2 H), 4 37 (dd, 2 H, J = 31 7, 12.7 Hz), 7 45-7 54 (m, 5 H)

EXAMPLE 15 1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt:

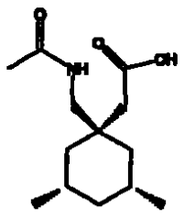


Example 14 (0 14 g, 1 21 mmol) was dissolved in 95% EtOH (50 mL), treated with sodium hydroxide solution (1 N, 1 21 mmol) as well as 20% Pd/C (0 1 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 45 minutes. The reaction was

filtered, treated with HCl/Et_2O (1 M, 1 mL), and concentrated in vacuo The residue was treated with hot iPrOH, the NaCl was filtered away, and the solution was concentrated in vacuo The crude product was recrystallized from iPrOH/acetone/hexane (7 150 110 mL) and dried under vacuum to give 0 189 (63%) of the desired product.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$), mp 182-183 °C, Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal) C 57 70, H 9 68, N 5 61 (found) C 57 47, H 9 58, N 5 35 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 52 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.2 Hz), 0 84-0.98 (m, 8 H), 1 57-1 72 (m, 5 H), 2.38 (s, 2 H), 2.72 (s, 3 H), 3.21 (s, 2 H).

EXAMPLE 16 1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid

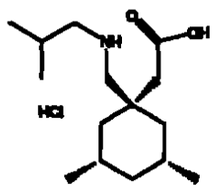


Example 8 (0 5 g, 2.1 mmol) was treated with H_2O (10 mL) and NaOH (0 56 g, 14 0 mmol), cooled to 0 °C, and treated with acetic anhydride. The reaction was stirred overnight at room temperature, then diluted with EtOAc (100 mL) and washed with 1 N HCl (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo. The crude material was chromatographed on silica gel eluting with 4% MeOH/CH_2Cl_2 to give 0 138 g (27%) of the desired product as an oil which solidified under vacuum.

MS 242 1 (M+1 for $C_{13}H_{23}N_1O_3$), mp 122-124 °C, Analysis ($C_{13}H_{23}N_1O_3$) (Cal.) C 64 70, H 9 61, N 5 80 (found) C 64 65, H 9 59, N 5 63 ^{1}H NMR (CD_3OD)

δ 0 46 (dd, 1 H, J = 23 7, 11 7 Hz), 0 81-0 87 (m, 9 H), 1 56 (d, 2 H, J = 13 4 Hz), 1 65-1 76 (m, 3 H), 1 98 (s, 3 H), 2 18 (s, 2 H), 3 30 (s, 3 H).

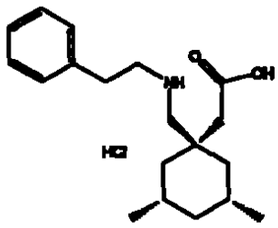
EXAMPLE 17 1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt



Example 17 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except isobutyraldehyde was used instead of propionaldehyde (53% yield)

MS 256 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$), mp 193-194 °C; ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 3, 12 5 Hz), 0 81-0 90 (m, 2 H), 0 89 (d, 6H, J = 6 4 Hz), 1 03 (d, 6H, J = 6 8 Hz), 1 57-1 71 (m, 5H), 2.09 (m, 1H), 2.49 (s, 2 H), 2.88 (d, 2H, J = 7 1 Hz), 3 19 (s, 2 H)

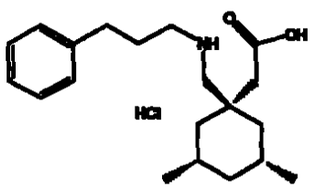
EXAMPLE 18 1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 18 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except phenylacetaldehyde was used instead of propionaldehyde (16% yield)

MS 304 (M+1 for $C_{19}H_{29}N_1O_2$), mp 188-189 °C, Analysis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 67 14, H. 8 90, N 4 12 (found) C 66 94, H. 8 91, N 3 98 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 46 (dd, 1 H, J = 24 6, 12.3 Hz), 0 81-0 91 (m, 8 H), 1 58-1 72 (m, 5 H), 2.50 (s, 2H), 3 04-3 08 (m, 2H), 3 26-3 30 (m, 4H), 7.23-7 75 (m, 5H)

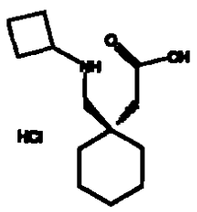
EXAMPLE 19 1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt.



Example 19 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except hydrocinnamaldehyde was used instead of propionaldehyde (50% yield)

MS 318 (M+1 for $C_{20}H_{31}N_1O_2$); mp 171-172 °C, Analysis ($C_{20}H_{31}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 67 87, H. 9 11, N 3 96 (found) C 67 83, H. 9 13, N 3 78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 6, 12.1 Hz), 0 80-0 90 (m, 2 H), 0 90 (d, 6H, J = 6 0 Hz), 1 60-1 72 (m, 5 H), 2.03-2.11 (m, 2H), 2.45 (s, 2H), 2.73 (t, 2H, J = 7 5 Hz), 3 06 (t, 2H, J = 7 7 Hz), 3.3 (s, 2H), 7.20-7 18 (m, 5H)

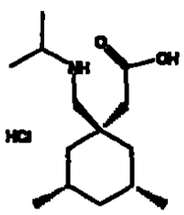
EXAMPLE 20 {1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 20 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except
cyclobutanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (70% yield)

MS 226 (M+1 for $C_{13}H_{23}N_1O_2$), mp 176-177 °C, Analysis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 59 64, H. 9.24, N 5 35 (found) C 59 88, H. 9 18, N 5 19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 16-1 60 (br , 10 H), 1 80-1 96 (m, 2 H), 2 21-2.40 (m, 4 H), 2.53 (s, 2H), 2.97 (s, 2H), 3 73 (m, 1H)

EXAMPLE 21 1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 21 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except acetone was used instead of propionaldehyde (50% yield)

MS 242 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$); mp 206-207 °C; ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 8, 12.5 Hz), 0 80-0 90 (m, 2 H), 0 99 (d, 6H, J = 6 1 Hz), 1 35 (d, 6H, J = 6 6 Hz), 1 55-1 78 (m, 5H), 2.45 (s, 2H), 3 18 (s, 2 H), 3 41 (m, 1H)

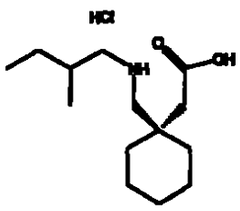
EXAMPLE 22 1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al US 4087544, May 2, 1978

EXAMPLE 23 1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 4087544, May 2, 1978

EXAMPLE 24 Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 4087544, May 2, 1978

EXAMPLE 25 Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 2960441, 1960

EXAMPLE 26 Synthesis of {1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt -



A solution of (1-aminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid (Example 22, 2.0 g, 11 7 mmol) in EtOH (100 mL) was treated with 2-methyl-butyraldehyde (4 mL, 35 1 mmol) and PtO_2 (0 5 g), and shaken under at atmosphere of H_2 (50 psi) for 2 h. The reaction was filtered, treated with 1 N HCl/Et_2O (12 mL), concentrated in

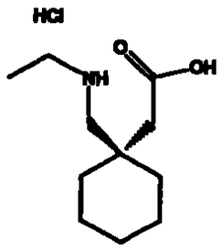
vacuo, dissolved in hot i-PrOH (10 mL), diluted with acetone (600 mL), cooled to 0 °C, and filtered to give 1 58 g (49%) of the desired product.

MS 242 1 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$), mp 162-163 °C, Analysis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 60 52, H. 10 16, N 5 04 (found) C 60 41, H 10.26, N 4 95 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 95 (t, 3 H, J = 7 3 Hz), 1 02 (d, 3 H, J = 6.6 Hz), 1 20-1 31 (m, 1 H), 1 42-1 56 (m, 11 H), 1 81-1 89 (m, 1 H), 2.63 (dd, 2 H, J = 18.3, 16 1 Hz), 2 82 (dd, 1 H, J = 12.5, 8 3 Hz), 2 99 (12.5, 6 1 Hz), 3 07 (dd, 2 H, J = 25 6, 12.9 Hz)

EXAMPLE 27 {1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that 4-trifluorobutyraldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (19% yield).

MS 282.1 (M+1 for $C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$); mp 163-164 °C, Analysis ($C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$.HCl.0 05H_2O) (Cal.) C: 49 00, H. 7 31, N 4 40 (found) C 48 60, H 7 29, N 4 19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 40-1 54 (m, 11 H), 1 96-2.04 (m, 2 H), 2.26-2.38 (m, 2 H), 2.57 (s, 2H), 3 09-3 13 (m, 4 H)

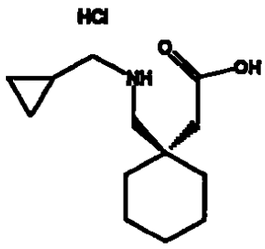
EXAMPLE 28 (1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt



Example 28 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that acetaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (30% yield).

MS 200 1 (M+1 for $C_{11}H_{21}N_1O_2$), mp 160-166 °C, Analysis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$.HCl) (Cal) C 56 04, H 9 41, N 5 94 (found) C 55 98, H 9 36, N 5 79 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 31-1 54 (m, 13 H), 2.54-2.56 (m, 2 H), 3 06-3 13 (m, 4 H).

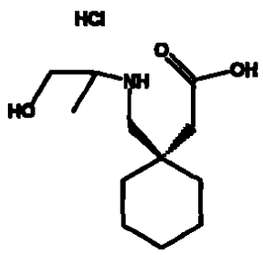
EXAMPLE 29 {1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 29 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclopropanecarboxaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (62% yield)

MS 226 (M+1 for $C_{13}H_{23}N_1O_2$), mp 177-178 °C, Analysis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 59 64, H 9.24, N 5 35 (found) C 59 72, H 9 15, N 5 27 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 50-0 56 (m, 2 H), 0 71-0 74 (m, 2H), 1 05-1 30 (m, 1H), 1 42-1 54 (m, 10H), 2 52 (s, 2H), 2.94 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 3 10 (s, 2H).

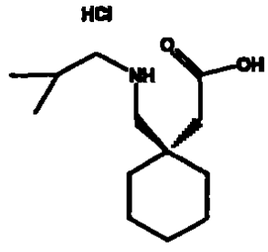
EXAMPLE 30 {1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 30 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that 1-hydroxy-2-propanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (60% yield)

MS 230 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_3$), mp 164-165 °C; Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_3$.HCl) (Cal.) C. 54 23, H 9 10, N 5 27 (found) C· 54.23, H. 9 01, N 5 18 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 30-1 32 (m, 3 H), 1 44-1 55 (m, 10H), 2.60 (s, 2H), 3 11 (m, 2H), 3 28 (br., 2H), 3 37 (br , 1H), 3 57-3 61 (m, 1H), 3 78-3 81 (m, 1H)

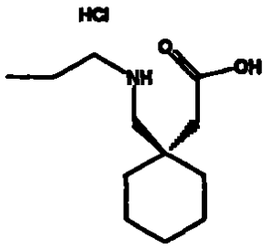
EXAMPLE 31 [1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 31 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclopropanecarboxaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (35% yield)

MS 228 (M+1 for $C_{13}H_{25}N_1O_2$), mp 175-176 °C, Analysis ($C_{13}H_{25}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 59 19, H. 9 93, N 5 51, (found) C: 59 28, H. 9 98, N 5.24 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 03 (d, 6H, J = 6.9 Hz), 1 37-1 60 (m, 10H), 2.10-2 17 (m, 1H), 2 63 (s, 2H), 2.87 (d, 2H, J = 7 4 Hz), 3 07 (s, 2H).

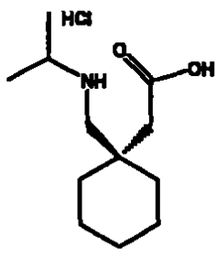
EXAMPLE 32 (1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt



Example 32 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that propionaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$); mp. 174-177 °C, Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal.) C. 57 70, H. 9 69, N 5 61 (found) C. 57.55, H. 9 77, N 5 48 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 93 (t, 1 H, J = 6 3 Hz), 0.99-1 03 (m, 4 H), 1 40-1 54 (m, 13 H), 1 72-1 78 (m, 2 H), 2.96-3 29 (m, 2 H).

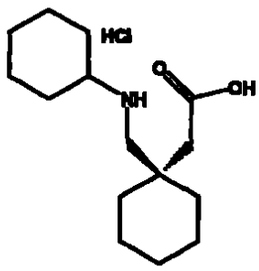
EXAMPLE 33 [1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 33 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that acetone was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$); mp 193-194 °C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.29-1 57 (m, 18 H), 2.59 (s, 2 H), 3 07 (s, 2 H), 3 38-3 42 (m, 1 H)

EXAMPLE 34 (1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt

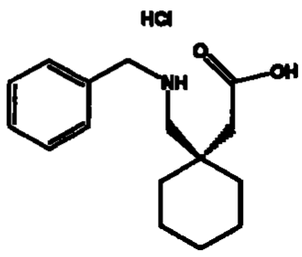


Example 34 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclohexanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (48% yield)

MS 254 (M+1 for $C_{15}H_{27}N_1O_2$); mp 198-199 °C; Analysis ($C_{15}H_{27}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 62 12, H 9 74, N 4 83 (found) C 62.18, H 9 84, N 4 75 ^{1}H NMR

(CD_3OD) δ 1 20-1 60 (m, 16 H), 1 63-1 76 (m, 1H), 1 88 (br , 2H), 2.13 (br., 2H), 2 60 (m., 2H), 3 09 (m., 3H)

EXAMPLE 35 [1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 35 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that benzaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 262 0 (M+1 for $C_{16}H_{23}N_1O_2$), mp 125-135 °C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 1 38-1 49 (m, 11 H), 2.55 (s, 2 H), 3 07 (s, 2 H), 4 23 (s, 2 H), 7 43-7 49 (m, 5 H)

EXAMPLE 36

Summary

Using an *ex vivo* model of freshly dissected rat retinas, the mechanisms by which brain glutamate levels are maintained within normal limits in neural tissue was investigated. Anaplerotic glutamate synthesis may be important to replenish glutamate oxidized in the glia following neurotransmission. Points of rate control through this *de novo* pathway were identified as pyruvate carboxylation and

branched chain amino transamination To test the relationship between glutamate synthesis and pyruvate carboxylase activity, synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ was measured as a function of medium pyruvate. Increasing pyruvate from 0.2 to 5 mM increased the ^{14}C-amino acid synthesis by 66 ± 15%. The specific radioactivity of glutamine relative to that of $H^{14}CO_3$ after 20 minutes of incubation indicated that ≈30% of glutamine in the retina is derived from bicarbonate fixation. To test the dependence of glutamate synthesis on availability of branched chain amino acids (BCAA) as a source of nitrogen, the effect of inhibiting the neuronal branched chain aminotransferase (BCATc) was measured Gabapentin (GBP) (1 mM), a selective inhibitor of BCATc in neurons, inhibited synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ by 31% without slowing $H^{14}CO_3$ incorporation into lactate and citric acid cycle intermediates. Inhibition of *de novo* glutamate synthesis was reversed by addition of 0 6 mM BCAA. The data indicated that pyruvate carboxylase and branched chain aminotransferase share rate control of *de novo* glutamate synthesis in the retina, and that *de novo* glutamate synthesis is quantitatively important for maintenance of retinal glutamate levels.

Methods

Experimental animals

Sprague Dawley rats (200-400g) were used for all experiments. Rats were housed under a 12 hour light/dark cycle, and fed and watered *ad libidum* After anaesthetizing the rats with-nembutal (IP), eyes were enucleated and retinas dissected in ice-cold buffer

CO_2 fixation

Freshly isolated half-retinas were preincubated at 37°C for 3 minutes in buffer A (pH 7 4) containing 118 mM NaCl, 4 7 mM KCl, 2.5 mM CaCl, 1 2 mM KH_2PO_4, 1 17 mM $MgSO_4$, 20 mM HEPES, 5 mM glucose, 0.05 mM NH_4Cl and 25 mM $NaH^{14}CO_3$ Pyruvate (either 0 2 or 5mM) was also included in the buffer 1 ml buffer as well as the gas phase within 20 ml vials were equilibrated with 95% O_2, 5% CO_2 Incubations were initiated by addition of 10 μCi/ml $H^{14}CO_3$ The vessels were then immediately closed to the atmosphere. Most incubations continued for 20 minutes, although in some preliminary studies, times were varied from 10-60 minutes. Reactions were stopped by removing the half retinas from the buffer and placing them in 2% perchloric acid. The buffer was separately acidified with perchloric acid (final concentration 2%) and unreacted $^{14}CO_2$ was allowed to diffuse out of the acidified samples.

The total amount of product (non-volatile carbon 14 metabolites) was determined by measuring the radioactivity in aliquots of the medium and tissue samples. Metabolites in the extracts were separated by Dowex-1 acetate chromatography as previously described. Williamson, J.R., and Corkey, B (1969) "Methods in Enzymology", Vol. 13, ed. Lowenstein, J.M. *(Academic Press)* pp 434-513, and quantified by scintillation counting. In most instances, individual metabolite carbon 14 data is reported as the sum of the radioactivity in the medium plus tissue extracts. Complete quantification of ^{14}C-metabolite amounts in both the retina and in the medium can be found below in Tables I and II.

Data not shown in the results and discussion sections where collected in the course of carrying out the evaluation of the influences of pyruvate on $H^{14}CO_3$ fixation in the retina. Figure 2 shows only the effect of pyruvate on the sum glutamate plus glutamine and the sum pyruvate plus lactate. Table I provides values for all metabolites that became labeled with $H^{14}CO_3$ and their compartmentation.

Likewise additional data, not shown in the results and discussion sections, were collected in evaluating the influence of gabapentin. Thus Table II is an expansion of the data shown in Figure 4, and provides values for all metabolites labeled with $H^{14}CO_3$ and their compartmentation.

Table I

Condition	Compartment	Gln	Glu	Asp	Lact	TCA cycle	Total
Control (0.2 Pyr)	in	0.59 ± 0.05	1.47 ± 0.29	0.85 ± 0.06	0.16 ± 0.06	1.02 ± 0.26	4.08 ± 0.41
	out	0.61 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.55 ± 0.03	0	1.19 ± 0.13
	sum	1.20 ± 0.09	1.51 ± 0.29	0.93 ± 0.08	0.71 ± 0.06	1.02 ± 0.26	5.27 ± 0.45
+5.0 Pyr	in	0.91 ± 0.13	2.67 ± 0.29	1.08 ± 0.12	0.29 ± 0.04	2.31 ± 0.13	7.26 ± 0.61
	out	0.96 ± 0.14	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	1.18 ± 0.11	0	2.24 ± 0.21
	sum	1.87 ± 0.23	2.73 ± 0.28	1.16 ± 0.12	1.47 ± 0.13	2.31 ± 0.13	9.50 ± 0.74

355444

Table II

Condition	Compartment	Gln	Glu	Asp	Lact	TCA cycle	Total
Control	in	0 440 ± 0 032	1 477 ± 0 097	0 634 ± 0 038	0 080 ± 0 008	1 096 ± 0 105	3 715 ± 0 266
	out	0 551 ± 0 036	0 008 ± 0 001	0 070 ± 0 003	0 478 ± 0 030	0	1 117 ± 0 075
	sum	0 991 ± 0 054	1 485 ± 0 096	0 704 ± 0 040	0 558 ± 0 031	1 096 ± 0 105	4 832 ± 0 303
+GBP	in	0 389 ± 0 026	1 324 ± 0 025	0 549 ± 0 019	0 089 ± 0 006	1 514 ± 0 103	3 902 ± 0 122
	out	0 545 ± 0 024	0 008 ± 0 002	0 035 ± 0 003	0 516 ± 0 030	0	1 066 ± 0 028
	sum	0 934 ± 0 036	1 332 ± 0 025	0 584 ± 0 022	0 605 ± 0 028	1 514 ± 0 103	4 968 ± 0 028
+GBP +BCAA	in	0 480 ± 0 011	1 549 ± 0 070	0 609 ± 0 021	0 086 ± 0 008	1.220 ± 0 116	3 989 ± 0 043
	out	0 806 ± 0 086	0 009 ± 0 001	0 093 ± 0 008	0 458 ± 0 048	0	1 322 ± 0 076
	sum	1 286 ± 0 082	1 558 ± 0 070	0 702 ± 0 016	0 5445 ± 0 040	1.220 ± 0 116	5 311 ± 0 119

09802T = 2E9E9E09

The chromatographic procedure employed in this example separates glutamine, glutamate, aspartate, and lactic acid. The citric acid cycle intermediates remain on the Dowex columns and are estimated as the difference between the total counts in the sample and the counts that are eluted. Evidence of the validity of this procedure has been reported previously Before subjecting samples to chromatography, ^{14}C-pyruvic acid in the samples was converted stoichiometrically to lactate by treating the samples with excess NADH and lactate dehydrogenase. Therefore the single lactate peak reported contains all carbon 14 in both lactate and pyruvate. To determine specific activity of glutamate and glutamine in the retinal samples, the mass amount of the glutamate was measured fluorometrically using a standard enzymatic procedure: Patel, M.S (1989) in Neuromethods. Carbohydrate and Energy Metabolism, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D *(The Humana Press, Inc.)* pp 309-340 The mass amount of glutamine was measured after chromatographic separation from glutamate followed by a luminometric determination previously described. ATP and creatine phosphate were measured fluorometrically using an enzymatic assay

Retinal protein was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) Each half retina contained about 0 4 mg protein.

3556445

Pyruvate Carboxylase Assay

Pyruvate carboxylase activity was assayed in fresh samples of whole brain and excised retinas The method described by Patel Patel, M.S (1989) in *Neuromethods Carbohydrate and Energy Metabolism*, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D (The Humana Press, Inc.) pp 309-340, was used and involves measuring $^{14}CO_2$ fixation under optimal conditions in sonicated tissue.

Western Blot

SDS-PAGE was performed as described Patel, M.S (1989) in *Neuromethods. Carbohydrate and Energy Metabolism*, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D (The Humana Press, Inc.) pp 309-340, using 10% gels. For immunoblotting, protein were transferred to Immobilon P membranes. Membranes were blocked with 5% BSA and incubated with immunoaffinity purified rabbit anti-rat BCATc peptide antibody (1 1000 dilution) or immunoaffinity purified rabbit anti-human BCATm peptide antibody (1 1000 dilution) The immunoreactive protein bands were visualized using the ECL system according to manufacturer's instructions (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)

Calculations and Statistics

Data are reported in text and figures by determining the dpm/mg in a particular metabolite and dividing by the specific activity of medium HCO_3 Therefore all data are reported as nmoles of $H^{14}CO_3$/mg protein for any given metabolite.

Results are reported as the mean ± standard error of the mean. Statistical significance was judged by paired t-test and a $p<0.05$ Numbers of independent determinations (n) are provided in figure and table legends.

05021-SE5695TUS

6680274 SEQ6970S

Results

Pyruvate carboxylase levels are similar in retina and whole brain

Patel demonstrated that pyruvate carboxylase is the major CO_2 fixing enzyme in the adult rodent brain. To judge whether this might also be true in the retina, the activity of pyruvate carboxylase at 37°C in sonicates from neocortex was compared with those from the retina. The neocortex levels (2.9 ± 0 1 nmoles $H^{14}CO_3$ fixed/min/mg) were similar to those found in sonicated retinal tissues (3 4 ± 0 4 nmoles $H^{14}CO_3$ fixed/min/mg), indicating that pyruvate carboxylase was just as active in retina as whole brain.

Rates of both $^{14}CO_2$ fixation and ^{14}C-glutamate appearance are a function of pyruvate levels in the retina

In preliminary experiments retinas were incubated with 0 2 mM pyruvate as described in methods for 10, 20, 40 and 60 minute periods. Total $^{14}CO_2$ was monitored as well as ATP and creatine phosphate levels. ATP and creatine phosphate levels remained constant as a function of time, demonstrating that oxygenation and pH control were adequate throughout. Total CO_2 fixation (5 50 ± 0 14 nmoles/mg protein) peaked between 20 and 40 minutes, but was already 76% of maximal (4 2 ± 0 1 nmoles/mg) at 10 minutes. Since ATP (20 ± 0.2 nmoles/mg) and creatine phosphate (16 ± 1 1 nmoles/mg) levels were high and did not change with time, this peak indicated that the rate of CO_2 fixation was constant, but that continuous breakdown of non-volatile carbon 14 products to

$CO_2 + H_2O$ produced a near steady state level of glutamate and glutamine specific radioactivity by 20 minutes.

To assess the control of pyruvate carboxylation over glutamate synthesis, retinas were incubated with either 0 2 or 5 mM pyruvate in the medium and intracellular and extracellular metabolites analyzed. The total $^{14}CO_2$ fixed in 20 minutes in the presence of 0 2 mM pyruvate was 5 27 ± 0 45 nmoles $H^{14}CO_3$/mg, whereas that fixed in the presence of 5 mM pyruvate was 9 50 ± 0 74 nmoles $H^{14}CO_3$/mg Figure 2 shows that increasing unlabelled pyruvate from 0 2 to 5 mM increases the sum ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine (from 1 74 ± 0 19 to2.90 ± 0 31 nmoles/mg, $p<0.005$) Figure 2 also shows that the higher pyruvate incubation increases the ^{14}C-lactate plus ^{14}C-pyruvate values. Thus, at steady state, an increase in pyruvate concentration from 0.2 to 5 mM increased incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate and glutamine by 66% whereas the increase in pyruvate increased $H^{14}CO_3$ incorporation into pyruvate and lactate by 111%. The carbon 14 cycled into pyruvate and lactate represents glial recycling through pyruvate carboxylase, malic enzyme and phosphoenolpyruvate carboxykinase and for the first time demonstrates active citric acid cycle decarboxylation in intact neural tissue.

These data show that an increase in flux through pyruvate carboxylase induces an increase in *de novo* synthesis of retinal glutamate. A somewhat larger increase in pyruvate recycling occurs simultaneously

A large fraction of total glutamine synthesis is derived from pyruvate carboxylation

The importance of pyruvate carboxylation as a source for replenishing the glutamate released from retinal nerve endings during neuronal transmission was assessed by determining the specific radioactivity of glutamine in retinal tissue incubated with medium containing $H^{14}CO_3$. A fixed proportion of glutamine synthesis in retina derives from unlabelled glutamate released by neurons and taken up by Müller glia. The remainder comes from glial α-ketoglutarate synthesized anaplerotically from pyruvate and $^{14}CO_2$. Therefore, the specific radioactivity of glutamine relative to the specific activity of $H^{14}CO_3$ provides a minimal value for the proportion of glutamine derived from anaplerosis. The product of pyruvate carboxylase in the glia is [1,4-^{14}C]-oxaloacetate. Both the 1 and 4 positions are labelled because the carbon 14 initially incorporated into the 4-C position of oxaloacetate is randomized between the 1 and 4 positions by equilibration of oxalacetate with symmetrical fumarate. The labelled oxaloacetate condenses with pyruvate to form citrate, which is then isomerized to isocitrate. [1,4-^{14}C]-isocitrate is oxidized and decarboxylated to [5-^{14}C] α-ketoglutarate by isocitrate dehydrogenase. Therefore the α-ketoglutarate synthesized anaplerotically has approximately half of the specific radioactivity of the original substrate $H^{14}CO_3$, depending on the degree of randomization of the label in oxaloacetate. This is also true of the glutamine synthesized from the [5-^{14}C] α-ketoglutarate.

The specific activity of glutamine was measured in the retinal tissue extracts incubated with 0 2 mM pyruvate and $H^{14}CO_3$ for 10, 20, 40 and 60 minutes. Only the tissue glutamine (not medium) is reported. Specific radioactivity of glutamine in the tissue was constant between 10 and 60 minutes. After 20 minutes of incubation the mass amount of glutamine in the tissue was

08027-SE9691

4 50 ± 0 44 nmoles/mg, and its specific radioactivity was 1970 ± 115 dpm/nmol or 0 158 ± 0 009 dpm/nmol of the bicarbonate specific activity This indicates that about 32% of the glutamine was produced by anaplerosis and pyruvate carboxylase.

The specific radioactivity of retinal glutamate (269 ± 8 dpm/nmol) was lower than that of glutamine and also constant as a function of time from 10-60 min. It was only 14% of the specific activity of glutamine. This suggests that glutamate metabolic turnover in the neurons is rapid with respect to anaplerotic synthesis However, since neuronal glutamate turnover cannot replenish the glutamate carbon skeleton lost during neurotransmission, the anaplerotic pathway is of prime importance in maintaining neuronal glutamate levels. The present data show unequivocally that the anaplerotic pathway provides a large (≈32%) proportion of the glutamine required for glutamate replenishment.

Synthesis of retinal glutamate and glutamine is partially dependent on branched chain amino acid transamination

Recent studies of glutamate synthesis in cultured astrocytes suggested that the conversion of α-ketoglutarate to glutamate could act as a rate-controlling step in anaplerotic synthesis of glutamate. Several groups have indicated that the α-amino group of glutamate cannot be supplied as ammonia and must therefore be supplied by transamination of α-ketoglutarate with another amino acid Kanamori, K., Ross, B.D., and Kondrat, R.W (1998) *J. Neurochem.* 70, 1304-1315, Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685, including our own Haberg, A., Qu, H., Bakken, I.J., Sande, L.M., White, L.R., Haraldseth, O., Unsgard, G., Assley, J., Sonnewald, U (1998) *Dev. Neurosci.* 20, 389-398 Branched chain amino acids are likely nitrogen contributors since they can cross the blood-brain and blood-retinal barriers efficiently Hutson and coworkers have proposed that a

nitrogen shuttle between neurons and glia which involves branched chain amino acids and two BCAT isoenzymes, one in neuronal cytosol (BCATc) and one in glial mitochondria (BCATm) can also provide the needed nitrogen. Hutson, S.M., Berkich, D., Down, P., Xu, B., Aschner, M., and LaNoue, K.F. (1998) *J Neurochem.* 71, 863-874. According to this hypothetical shuttle, neuronal BCATc facilitates glial BCATm conversion of α-ketoglutarate to glutamate by providing BCAA regenerated in the neurons (cf Figure 1).

As a first step toward investigating the role of the BCAT isoenzymes in *de novo* glutamate synthesis in the retina, immunoblotting with BCATm and BCATc specific antibodies was used to determine whether the BCAT isoenzymes are expressed in rat retina. As shown in Figure 3, both BCATc and BCATm are expressed in the retina at levels that are comparable to those found in whole brain homogenates. Therefore, freshly dissected rat retina is an appropriate intact neural system in which to test the concept of nitrogen shuttling between neurons and glia.

The leucine analog gabapentin (GBP) is a neuroactive drug which inhibits BCATc, but not BCATm. Su, T.-Z., Lunney, E., Campbell, G., Oxender, D.L. (1995) *J. Neurochem.* 64, 2125-2131. It was confirmed that GBP inhibits the synthesis of leucine in freshly dissected rat retinas (data not shown). The effect of GBP on the synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ in *ex vivo* rat retinas was then measured. As shown in Figure 4, 1 mM GBP reduced formation of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine to 71% of control values (2.26 ± 0.05 versus 3.18 ± 0.12 nmol/mg, $p<0.001$). Addition of 200 μM each of leucine, isoleucine and valine reversed the inhibition to 89% of control (2.84±1.15 nmol/mg, $p<0.01$ versus GBP alone). There was no effect of GBP on either ATP or creatine phosphate indicating that the GBP did not impair retinal bioenergetic processes. The small increase in incorporation of carbon 14 into lactate and citric

acid cycle intermediates (from 1 93 ± 06 to 2.12 ± 0 13) due to the presence of 1 mM GBP was not significant. Incorporation of the label into all of the metabolites is shown in Table II.

Further experiments were carried out to investigate dose/response properties of GBP Freshly dissected retinas were incubated for 20 minutes in buffer A containing either 0, 0.2, 1, or 5 mM GBP As shown in Figure 5, increasing the concentration of GBP over 1 mM did not significantly increase the extent of its inhibition of the synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ Again GBP has no influence on formation of citric acid cycle intermediates, lactate and pyruvate (Figure 5) This supports the proposal that the site of GBP inhibition of glutamate synthesis is the BCAT mediated conversion of α-ketoglutarate to glutamate.

Discussion

The studies described evaluated mechanisms for maintenance of CNS glutamate levels. Previous studies showed that glutamine synthetase is required in retinas and hippocampal slices to maintain levels of neuronal glutamate Su, T -Z , Lunney, E., Campbell, G., Oxender, D.L. (1995) *J. Neurochem.* 64, 2125-2131 Immunocytochemical measurements indicate that 90% or more of retinal and whole brain glutamate is neuronal and that inhibition of glutamine synthetase for 90 minutes depletes the neuronal glutamate pool to negligible levels. Ottersen, O.P , Zhang, N , and Walberg, F (1992) *Neuroscl* 46, 519-534 This demonstrated that glutamine synthetase is required for maintenance of neuronal glutamate. Although glutamate can be synthesized in neurons from α-ketoglutarate, lack of pyruvate carboxylase or another anaplerotic enzyme

prevents replenishment of α-ketoglutarate, and thus, precludes net glutamate synthesis within the neurons except from glutamine via glutaminase.

In this example the sources and control of glutamine synthesis was investigated by incubating excised retinas with $H^{14}CO_3$ and measuring the appearance and specific radioactivity of ^{14}C-glutamine and ^{14}C-glutamate. More ^{14}C-glutamine is synthesized in the presence of 5 mM pyruvate than in the presence of 0 2 mM. This indicates that pyruvate carboxylase activity influences the rate of glutamine synthesis. However, lack of sensitivity of this control is demonstrated by the observation that when pyruvate is increased from 0.2 mM to 5 mM the magnitude of the increase in pyruvate carboxylase flux (80 3%) is not directly translated into an equivalent increase in ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine (69 0%) Flexibility of the control is provided by the potential for citric acid cycle decarboxylation and pyruvate recycling. The pyruvate dependence of total $H^{14}CO_3$ fixation in retinal tissue was similar to that seen in cultured isolated astrocytes. Gamberino, W C., Berkich, D.A., Lynch, C.J., Xu, B., and LaNoue, K.F (1997) *J Neurochem.* 69, 2312-2325 However, in astrocytes, which have no way to regenerate endogenous BCAA used to transaminate α-ketoglutarate, the pyruvate-induced increases in CO_2 fixation were not translated into increases in ^{14}C-glutamate and ^{14}C-glutamine levels. Instead, the carbon 14 accumulated solely in citric acid cycle intermediates and into "recycled" pyruvate.

In the retinal studies reported here, the specific radioactivity of glutamine at steady state was 0 158 of the bicarbonate specific activity Since, approximately half of the ^{14}C incorporated into oxalacetate is retained in α-ketoglutarate, the results show that ≈ 32% of the glutamine is derived from $H^{14}CO_3$ This is the first direct estimate of the contribution of anaplerosis to glutamine synthesis in a neuronal tissue. Previous estimates have been indirect, and involved isotopomer

analysis of NMR spectra following infusion of ^{13}C glucose (3-5, 11-13) into intact brains. Estimates of the contribution of pyruvate carboxylation to glutamine synthesis using these NMR methods have been lower than the present one, and range from less than 1% (3) to 5-10% (4,5) to 20-25%. Shank, R.P., Bennet, G S., Freytag, S O., and Campbell, G.L. (1985) *Brain Res.* 329, 364-367, Griffen, J.L., Rae, C , Radda, G.K., and Matthews, P M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 297-307, depending largely on mutual assumptions of the mathematical models employed. The present results suggest that glial pyruvate carboxylation and the conversion of citric acid cycle intermediates to glutamate and glutamine are likely to be quantitatively important for retinal function and possibly for whole brain function.

The observation that GBP slows the conversion of citric acid cycle intermediates to glutamine and glutamate strongly suggests that neuronal synthesis of BCAA by BCATc is necessary for optimal rates of amination of α-ketoglutarate to glutamate. A reasonable scheme for their involvement in this process is shown in Figure 1

The results, which demonstrate inhibition of ^{14}C-glutamate and ^{14}C-glutamine synthesis from $H^{14}CO_3$ by GBP and reversal of the inhibition by BCAA, are consistent with the described shuttle. The hypothesis also provides a possible explanation for the anti-epileptic action of GBP Taylor, C.P , Gee, N S , Su, T.Z., Kocsis, J.D , Welty, D.F , Brown, J.P., Dooley, D.J , Boden, P , Singh, L. (1998) *Epilepsy Res.* 29, 233-249 Indeed, decreased glutamate synthesis is a common action of GBP and the anti-epileptic carbonic anhydrase inhibitors Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W S , LaNoue, K.F , Lynch, C.J (1997) *Dev Neurosci.* 19, 162-171 Also, Maple Syrup Urine Disease, the hereditary ailment caused by a mutation of the gene for branched chain keto acid dehydrogenase, if

untreated induces high serum BCAA in patients and subsequent neurological abnormalities Chuang, D I and Shih, V.E. (1995) *In The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, S , and Vaule, D (McGraw-Hill) pp 1239-1277, which may be related to abnormal regulation of glutamate synthesis. Finally, the implications of nitrogen shuttling during glutamate synthesis must be studied further in light of the efficacy of GBP in the treatment of neuropathic pain Ottersen, O.P., Zhang, N , and Walberg, F (1992) *Neurosci.* 46, 519-534 and neurodegeneration, Chuang, D.I. and Shih, V.E. (1995) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, S., and Vaule, D (McGraw-Hill) pp 1239-1277, Rothstein, J.D and Kuncl, R.W (1995) *J. Neurochem.* 65, 643-651

EXAMPLE 37

Enzyme preparation. Frozen rat brains were thawed on ice and minced into fine pieces. For each brain 5 ml of isotonic buffer [225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM MOPS (pH 7 1), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT containing leupeptin, pepstatin and PMSF] was added. The samples were homogenized in Potters homogenizer (B Bran Biotech International) at 500 rpm for ten strokes, followed by additional ten strokes at 800 rpm. The homogenates were centrifuged in Beckman J2-M1 centrifuge with rotor JA-20 at 19, 000 rpm for 1 hr The supernatant was dialyzed with at least three changes of dialysis buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM MOPS pH 7 1, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1 mM DTT) for 24 hrs. The resulting enzyme was stored at –80 °C for further assays.

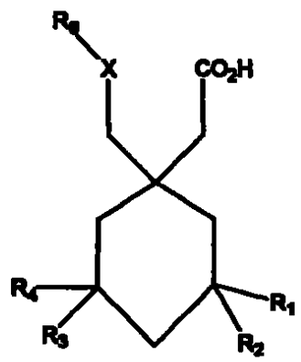
Assay of BCAT· The reaction was done in 1 5 ml Eppendorf tubes in a volume of 100 µl containing 50 mM Tris-HCL (pH 8 3), 25 µM [^{14}C] L-leucine, 10 mM 2-oxoglutarate, 15 µM pyridoxal phosphate, 1 mM DTT, and enzyme. The solutions for the reaction mixture were made in 10-fold concentrations. After 10 min incubation at room temperature (22 °C), the reaction was stopped by adding

100 µl of 15 mM p-nitrophenyl hydrazine in 2 M HCL. After a few minutes, 1 mL of a toluene-based scintillation liquid (4 5 g of PPO and 0 5 g of bis-MSB in 1 liter of toluene) was added, the tube was capped and mixed thoroughly with a Vortex mixer Then the tubes were centrifuged at 13, 500 rpm (Eppendorf centrifuge 5415C) for 10 min. Six hundreds µl of organic layer from each tube was placed into scintillation vials, followed by adding 10 ml of scintillation cocktail for counting.

99802T' 5E5991C3

CLAIMS

1 A compound of Formula IV



IV

R1-R4 are hydrogen or alkyl,

X is NR5 or O;

R5 is hydrogen or alkyl,

R6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R_1-R_4 are each hydrogen the R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

2. A compound according to Claim 1 wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are alkyl, R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is alkyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6; X is O; R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy, and R_6 is allyl

3 A compound according to Claim 1 wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen; R_1 is methyl and R_2-R4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6; R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl,

R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl

4 A compound according to Claim 1 wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen.

5 A compound according to Claim 1 and selected from.
(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid;
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Ethylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Benzylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Butylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylammomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

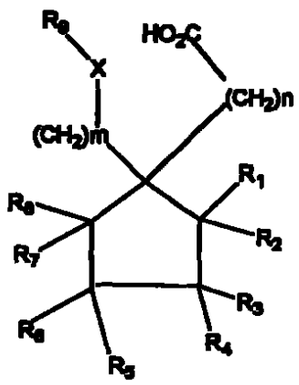
(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

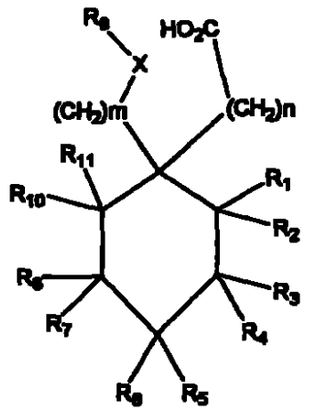
(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

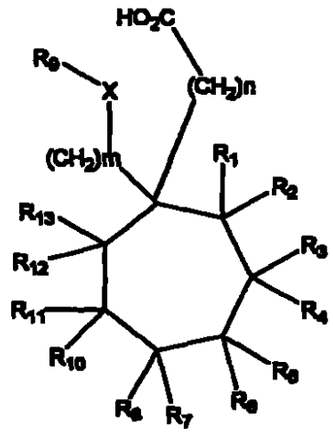
6 A method for treating diabetic retinopathy comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formulas I, II, and/or III to a patient in need thereof



I



II



III

wherein

R_9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

$R_1 - R_9$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

X = NR_{14}, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

7 The method of Claim 6 wherein m and n are 1, X is NR_{14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_6 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_8 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R_9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_9 are H, or R_2 is methyl.

8 The method of Claim 6 wherein R_9 is alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_9 and R_{11} are alkyl, R_1-R_8 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

9 The method of Claim 6 wherein the compound is selected from.

(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

(±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,

1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-ammomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

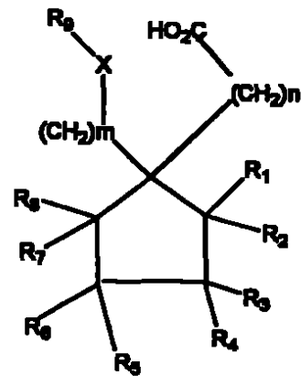
(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

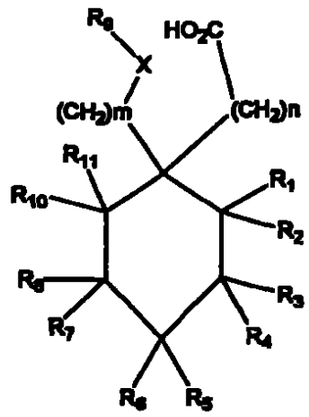
(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

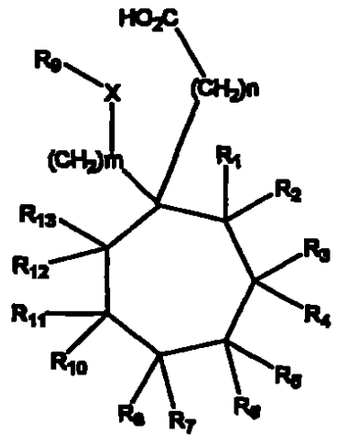
10 A method for inhibiting the branch chain amino acid-dependent aminotransferase in a patient in need thereof comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formulas I, II, and/or III



I



II



III

wherein,

R_9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

$R_1 - R_8$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

X = NR_{14}, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof

11 The method of Claim 10 wherein wherein m and n are 1, X is NR_{14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_6 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_8 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R_9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_8 are H, or R_2 is methyl

12. The method of Claim 10 wherein R_9 is alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

13 The method of Claim 10 wherein the compound is selected from.
(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

6868027 "SEP 1 2005

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,
(1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;
(cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Benzylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-(Isobutylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,
{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-(Isopropylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;
1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,
1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

14 A method for treating neurological disorders, depression, anxiety, panic, mania, bipolar disorders, antiflammatory diseases, glaucoma, pain or gastrointestinal damage comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formula IV to patient in need thereof.

R1-R4 are hydrogen or alkyl,

X is NR5 or O;

R5 is hydrogen or alkyl,

R6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R_1-R_4 are each hydrogen the R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

106

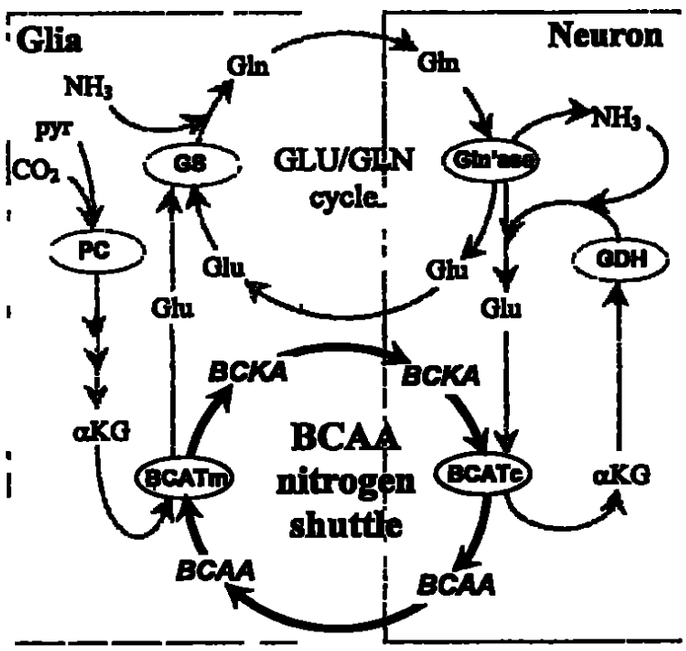
384
470

ABSTRACT

The present invention is directed to a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy The method involves the administration of an inhibitor of the branch chain amino acid-dependent aminotransferase (BCAT) pathway to an animal, such as a mammal, in particular a human, in an amount sufficient to treat the retina for diabetic retinopathy prophylactically or therapeutically The present invention is also directed to several novel inhibitors of the BCAT pathway

60880271 5E396105

Figure 1


Glia
Neuron
Gln
Gln
NH3
NH3
pyr
CO2
GS
GLU/GLN
cycle
Gln'ase
PC
Glu
Glu
Glu
Glu
GDH
BCKA
BCKA
αKG
BCAA
nitrogen
shuttle
BCATm
BCATc
αKG
BCAA
BCAA

383 108

Figure 2 472

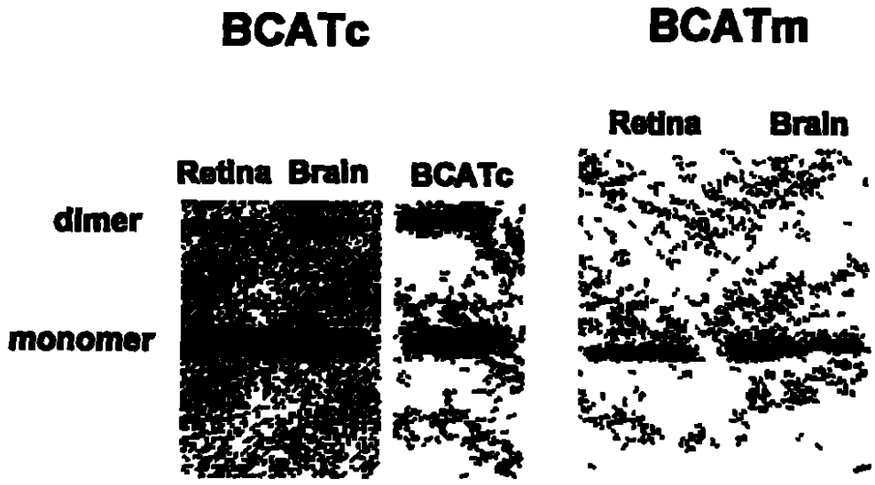
Express Mail No. EV760533670US

SEGEGTOS : 12GGGE

66802T"5259STU5

384 109

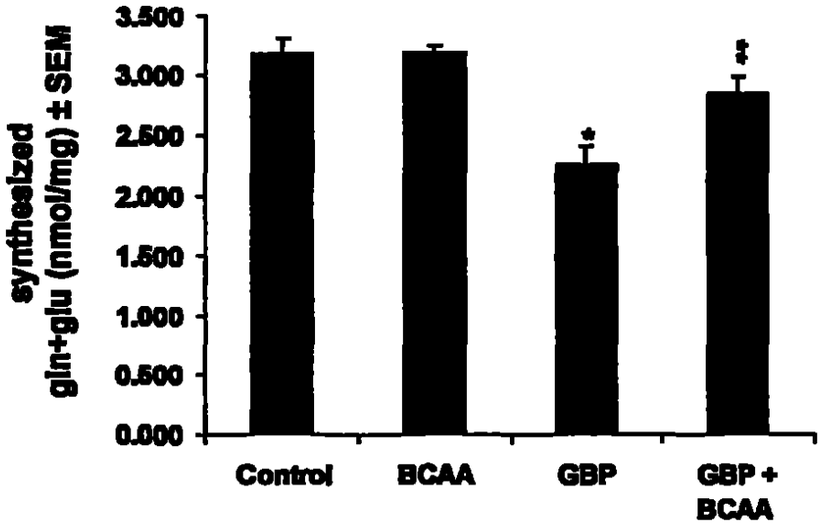
Figure 3 473



Express Mail No EV760533670US

385 AP

Figure 4 474



Express Mail No EJ767605336US

386 AAA

Figure 5

475

Express Mail No EV760533670US

09680247 - 052699705

380

476

TRADUCCION----------

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA ----------

A quien corresponda DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos ------

---

----------22 de septiembre de 2000----

Se certifica por el presente que el documento adjunto es una copia fiel de los registros que obran en la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos de los papeles de la solicitud de patente que se detalla más abajo, la cual ha cumplido con los requisitos para otorgarse una fecha de registro segun 35 USC 111 ----------

NUMERO DE SOLICITUD 60/169 635----------

FECHA DE REGISTRO 08 de diciembre de 1999 ----------

Por autoridad del Comisionado de Patentes y Marcas [Hay una firma ilegible] W MONTGOMERY, Funcionario de certificaciones ----------

[Hay un sello al agua de color dorado que dice] Oficina de Patentes y Marcas, Estados Unidos de Norteamérica----------

---

Tipear Un signo más (+) dentro de este casillero → + -------

Caso Numero A00000151L1-01-MJA----------

CARATULA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTES (Gran Empresa)----------

339 AA
477

[Sobre el margen izquierdo aparece un código de barras con los siguientes datos] JC712 U S PTO 12/08/99----------

[Sobre el margen derecho aparece un código de barras con los siguientes datos] JC553 U S PTO 60/169635 12/08/99---------

[Sobre el mismo margen dice] CORREO EXPRESO No EJ676053367US----------

La presente es una solicitud para presentar una SOLICITUD PROVISIONAL según CFR 37 1 53 (c)----------

INVENTOR(ES) SOLICITANTE(S) ----------

NOMBRE DE PILA Justin Stephen----------

APELLIDO Bryans----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) Dean Cottrage, 3 West Wickham Road, Balsham CB 1 6DZ, Reino Unido ----------

---

NOMBRE DE PILA Lain-Yen----------

APELLIDO Hu----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 4881 S Ridgeside Circle, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Susan M ----------

APELLIDO Hutson----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 1123 W 4th St Winston-Salem, North Carolina 27101 ----------

---

NOMBRE DE PILA Kathrin Foley----------

390 715
478

APELLIDO LaNoue----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 417 Hilltop Rd , Hummelstown, PA 17036 ----------

---

TITULO DE LA INVENCION (Máximo 280 caracteres)----------

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABETICA----------

---

DOMICILIO POSTAL ----------

Dirigir Toda la correspondencia a [ ] Número de cliente [En blanco] (por favor colocar la etiqueta con el código de barras del numero de cliente aquí) o,----------

[X] Nombre de la Compañia o individual Michael J Atkins ----

Warner Lambert Company----------

2800 Plymouth Road----------

Ann Arbor----------

Estado Michigan, **Codigo postal** 48105, **Pais** Estados Unidos de Norteamerica, Teléfono 734-622-5218, Fax 735-622-1553-----

---

PARTES DE LA SOLICITUD QUE SE ADJUNTAN (tildar todas las que se presentan)----------

(X) Memoria descriptiva, Número de páginas 84----------

(-) Dibujos, Número de páginas 5----------

391 479 AA6

(X) Otros (especificar) ----------

13 reivindicaciones en 14 páginas----------

Resumen en 1 página----------

FORMA DE PAGO (tildar una)----------

(X)Se adjunta un cheque u orden de dinero para cubrir el arancel de presentacion----------

(-) El comisionado esta autorizado por la presente a cambiar los aranceles y crédito de presentacion y el Numero de Cuenta de Depósito 23-0455----------

MONTO DEL ARANCEL DE PRESENTACION PROVISIONAL ($) 150 00------

---

La invención fue realizada por una oficina del Gobierno de los Estados Unidos o segun un contrato con una oficina del Gobierno de los Estados Unidos (X) No, (-) Sí, el nombre de la agencia del Gobierno de los Estados Unidos y el numero del contrato del Gobierno son (en blanco)----------

Saluda atentamente,----------

FIRMA (hay una firma ilegible) Fecha 12 de agosto de 1999 -

Nombre impreso o a maquina Michael J Atkins----------

Número de matrícula (si corresponde) 35 431----------

SOLAMENTE PRESENTACION DE SOLICITUD PROVISORIA----------

ENVIAR A Casilla de Solicitud de Patentes Provisorias, Comisionado Asistente para Patentes, Washington, D C 20231---

[Pagina 1 de 2] P19LARGE/REV04----------

392
480

CARATULA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTES (Gran Empresa)----------

NOMBRE DE PILA Erich----------

APELLIDO Lieth----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 1425 Bradley Ave , Hummelstown, PA 17036 ----------

---

NOMBRE DE PILA Michael Francis----------

APELLIDO Rafferty----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 3711 Rolling Ridge Court, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Todd Robert----------

APELLIDO Ryder----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 521 N Ashley Street, Ann Arbor, Michigan 48103 ----------

---

NOMBRE DE PILA Ti-Zhi----------

APELLIDO Su----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 2519 Meade Court, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Devin Franklin----------

APELLIDO Welty----------

398
481

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 2213 Placid Way, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

Certificado de Envío por correo Expreso ----------

Certifico que esta solicitud y el arancel que se adjunta se deposita el día 8 de diciembre de 1999, con el Servicio postal de los Estados Unidos "Oficinal postal de Correo Expreso al Destinatario", segun C F R 37, 1,10 y está dirigida al Comisionado Asistente de Patentes, Washington, D C 20231----

Firma de la persona que envia la correspondencia [Aparece una firma ilegible]----------

Nombre impreso o a máquina de la peraona que envía la correspondencia Linda A Zerby----------

SOLAMENTE PRESENTACION DE SOLICITUD PROVISORIA----------

ENVIAR A Casilla de Solicitud de Patentes Provisorias, Comisionado Asistente para Patentes, Washington, D C 20231---

[Pagina 2 de 2] P19LARGE/REV04----------

Correo expreso No EJ676053367US----------

PD-A0000151L1-01-MJA----------

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABETICA----------

---

379 449
482

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATIA DIABETICA

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Más de 14 000 000 de personas en los Estados Unidos padecen diabetes Todas las personas con diabetes están en riesgo de complicaciones retinales Sin embargo, las personas que sufren la diabetes de tipo I, es decir insulino dependiente, se enfrentan a un mayor riesgo de pérdida de la visión severa que las personas que sufren la diabetes de tipo II, es decir no insulino dependiente

Inicialmente, el nivel alto de glucosa en sangre en las personas diabéticas produce un aumento en los factores crecimiento en sus ojos Esta condición se denomina "etapa de retinopatía pre-diabética" y puede conducir a la retinopatía diabética total, si no se la trata profilácticamente

La retinopatía afecta a la mayor parte de las personas diabéticas en alguna medida durante sus vidas Es la causa principal de la ceguera en los estadounidenses de 20 a 74 años en la actualidad, y se espera que deteriore la visión en aproximadamente un tercio de las personas diabeticas en los

394 AMD
483

Estados Unidos Cada año en los Estados Unidos, ocurren tantos como 40 000 nuevos casos de ceguera entre las personas diabéticas (CDC, datos no publicados, 1993) Las personas diabéticas son 25 veces más propensas que la población general a quedar ciegas debido a la retinopatía

La retinopatía diabética tiene dos etapas una etapa no proliferativa, que típicamente ocurre primero, y una etapa proliferativa La etapa no proliferativa, que también se denomina "retinopatía diabetica de fondo", se caracteriza por el engrosamiento de la membrana de base, la pérdida de pericitos retinales, las anormalidades microvasculares, los microaneurismas intraretinales, y las hemorragias retinales (también llamadas hemorragias de "mancha de punto"), edema retinal, en particular el edema macular diabético, el cierre de vasos capilares asociado con la isquemia retinal o la mala perfusión retinal (es decir el mal desarrollo de vasos) y exudados blandos y duros La etapa proliferativa, que afecta a aproximadamente 700 000 estadounidenses (Chen et al, J Miss State Med Assoc 36(7) 201-208 (1995)), se caracteriza por la neovascularización y el crecimiento fibrovascular (es decir, la cicatrización que involucra a elementos gliales y fibrosos) desde la retina o el nervio óptico sobre la superficie interior de la retina o el disco o la cavidad vitrea

395 421
484

La etapa proliferativa puede conducir al glaucoma rubeótico o neovascular El edema macular puede ocurrir en cualquier etapa y, junto con las complicaciones surgidas de la neovascularización retinal, son los dos principales problemas retinales que causan la pérdida de la visión relacionada con la diabetes

Si bien las etapas patológicas de la retinopatía diabética se han descripto bien, los eventos moleculares que subyacen a la retinopatía diabética son pobremente comprendidos Esto se debe, en parte al hecho de que la enfermedad avanza durante diez a treinta años, segun cada individuo

el control estricto de la glucemia y la hipertensión y el examen oftálmico de la diabetes parece beneficioso para prevenir la enfermedad El tratamiento actual consiste en la observación regular por un oftalmólogo, la fotocoagulacion por láser y la vitrectomía

El edema macular que amenaza o involucra al centro macular se trata con la fotocoagulación macular focal Las cauterizaciones por láser de intensidad moderada, pequeñas (de 50 mu de diámetro), son apuntadas a las áreas de pérdidas en la mácula (Murphy, Amer Family Physician 51(4) 785-796

(1995)) Si el edema macular persiste, puede ser necesario volver a tratarlo

Los pacientes con retinopatía no proliferativa severa a muy severa y los pacientes que están en riesgo de sufrir retinopatía proliferativa o que ya sufren retinopatía temprana o avanzada, son tratados con fotocoagulación difusa o panretinal La fotocoagulación panretinal consiste en 1 500-2 000 cauterizaciones con láser, que tienen 500 mu de diámetr, en la porción periferica media y periférica de la retina (Murphy (1995), citada arriba)

El mecanismo bioquímico mejor documentado para el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la diabetes es la vía del sorbitol En la vía del sorbitol, la enzima de reductasa de aldosa cataliza la conversión de la glucosa en sorbitol y de la galactosa en galactitol La reductasa de aldosa tiene baja afinidad con la glucosa Por consiguiente, cuando las concentraciones de glucosa son normales, la vía está inactiva Durante la hiperglucemia, la vía del sorbitol se activa La activación de la vía del sorbitol es importante para los pericitos retinales, por ejemplo, que no requieren insulina para la penetracion de la glucosa En forma similar, las células capilares retinales parecen contener cantidades

123
398
486

sustanciales de reductasa de aldosa (Ferris, Hospital Practice 79-89 (15 de mayo de 1993)

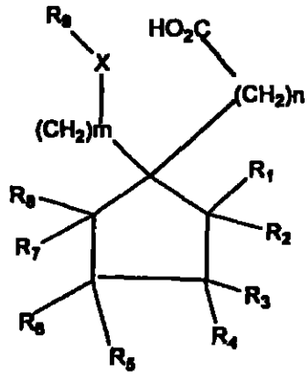
Dada la prevalencia del a retinopatia diabética, aun existe una necesidad de un tratamiento profiláctico y terapéutico efectivo de la enfermedad Por consiguiente, el principal objetivo de la presente invención es proporcionar un método para tratar profiláctica y terapéuticamente la retinopatía diabética, incluyendo el tratamiento en la etapa de la retinopatia prediabética, en la etapa de la retinopatía no proliferativa, y en la etapa de la retinopatía diabética proliferativa Éste y otros objetivos de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada que se ofrece en la presente invención

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

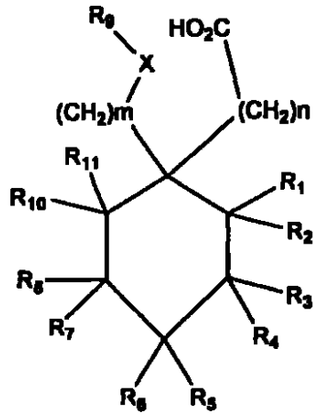
La presente invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatia diabética, que incluye el tratamiento en la etapa de la retinopatía prediabética, en la etapa de la retinopatía diabética no proliferativa y en la etapa de la retinopatica diabética proliferativa El método comprende la administración de un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada Preferentemente, el

398
487

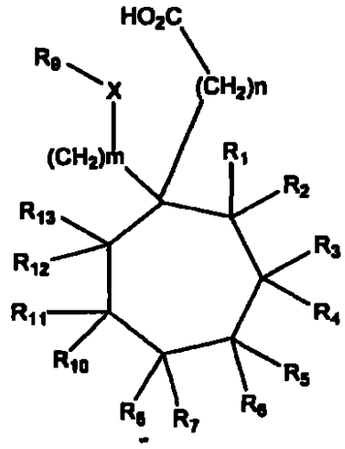
inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) es un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III



I



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halógeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo, alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un numero entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

X = NR_{14}, O, o S,

donde hay más de un estereoisómero, cada centro quiral puede ser en forma independiente R o S, o una sal, éster, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

Los compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula I, II o III en donde m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H, R_9 es alquilo, R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H, R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

Compuestos más preferidos son aquellos de la Fórmula II en donde R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es O

Compuestos especialmente preferidos se seleccionan de

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido (1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

~~403~~
491

Ácido trans-((1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético;

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

A30

~~405~~
493

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

494

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

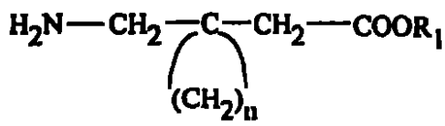
Sal de clorhidrato del acido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

Varios de los compuestos descriptos por las Fórmulas I, II y III son conocidos

Los compuestos de la Formula A



A

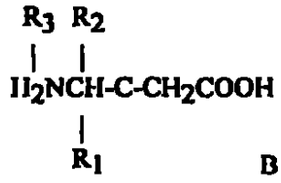
en donde R_1 es hidrógeno o un radical de alquilo inferior y n es 4, 5 o 6 son conocidos en la Patente Estadounidense Numero 4 024 175 y la Patente Estadounidense divisional Número 4 087 544 Los usos revelados son efecto protector contra el calambre inducido por la tiosemicarbazida, acción protectora contra el calambre de cardiazol, las enfermedades cerebrales, la epilepsia, los ataques de desvanecimiento, la hipocinesia,

A-32

~~409~~
495

y los traumas craneales, y el mejoramiento de las funciones cerebrales Los compuestos son útiles en pacientes geriátricos Las patentes se incorporan en la presente invención como referencia

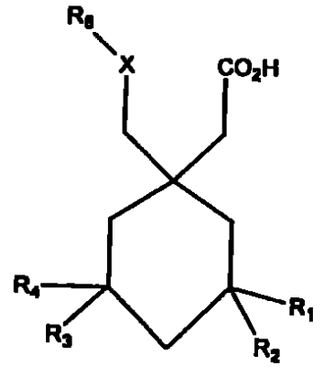
Los compuestos de la Formula B



B

o una sal farmacéuticamente aceptable de ellos, en donde R_1 es un grupo alquilo de cadena recta o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo o cicloalquilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, R_2 es hidrógeno o metilo, y R_3 es hidrógeno, o carboxilo son conocidos en la Patente Estadounidense Numero 5 563 175 y sus diversas divisionales Estas patentes se incorporan en la presente invención como referencia

La presente invención también revela compuestos novedosos de la Fórmula IV



IV

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrógeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmacéuticamente aceptable de él Al igual que los compuestos de las Fórmulas I, II y III, los compuestos son utiles para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatía diabética, incluyendo el tratamiento en la etapa de la retinopatía prediabética, en la etapa de la retinopatía diabetica no proliferativa y en la etapa de la retinopatia diabética proliferativa

Los compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula IV en donde R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son alquilo, R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es

alquilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, X es O, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo R_6 es fenialquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

Otros compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula IV en donde R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenilalquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

Compuestos especialmente preferidos se seleccionan de

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

498

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acetico,

A36

410
499

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acetico,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

A-32

43
501

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acetico,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acetico,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

414
502

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del acido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

La presente invención es también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la Fórmula IV y un portador farmacéuticamente aceptable

Los compuestos de la Fórmula II, tales como la gabapentina, son utiles para tratar diversas condiciones tales como un trastorno neurodegenerativo (US 5 084 479), la depresión (US 5 025 035), la ansiedad/pánico (US 5 792 796), la mania/trastornos bipolares (US 5 510 381), las enfermedades antiinflamatorias (WO 98 158641), la lesión gastrointestinal (WO 99 108670), el glaucoma y el dolor Como los compuestos de la Fórmula II y de la Fórmula IV funcionan ambos para afectar la vía del BCAT y afectar la sintesis del glutamato, que está involucrada en cada una de las condiciones mencionadas anteriormente, los compuestos de la Formula IV son útiles para

415
503

tratar las condiciones Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de los compuestos de la Fórmula IV para tratar cada uno o más de uno de los trastornos neurodegenerativos (que incluyen en forma no taxativa ALS, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer), la depresión la ansiedad/pánico, la manía/trastornos bipolares, las enfermedades antiinflamatorias, el glaucoma, el dolor o la lesión gastrointestinal

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 Esquema que muestra la lanzadera de BCAT en la retina La característica de lanzadera está resaltada y muestra cómo los amínoácidos de cadena ramificada en la glia pueden transaminar un α-cetoglutarato para formar un glutamato El producto de BCKA se difunde en el intersticio (mostrado en gris) hacia las neuronas donde es convertido nuevamente en el aminoácido de cadena ramificada mediante la transaminación con glutamato a través del BCATc Las abreviaturas son las siguientes BCAA = aminoácido de cadena ramificada, GLU = glutamato, GLN = glutamina, Gln'asa = glutaminasa, pyr = piruvato, PC = carboxilato de piruvato, αKG = α-cetoglutarato, BCATm = aminotransferasa , de cadena ramificada de la mitocondria, BCATc = aminotransferasa de

A41
415
504

cadena ramificada citosolica, BCKA = cetoácido de cadena ramificada, GDH = deshidrogenasa de glutamato

Figura 2 Efecto de la concentración de piruvato en la incorporación de $H^{14}CO_3$ en glutamato más glutamina (A) y en el piruvato *más* lactato (B) *por* retinas *ex vivo* Se incubaron hemi-retinas a 37°C en condiciones estándar con $H^{14}CO_3$ a 25 mM durante 20 minutos El piruvato en el medio estaba a 0,2 o 5 mM Los valores mostrados son medio ± SEM (n= 4, * p<0,05) Abreviaturas gln+glu = suma de glutamina más glutamato, pyr+lact = suma de piruvato etiquetado más lactato

Figura 3 Expresión de las isoenzimas de BCAT en retinas de ratas La extracción de tejidos, SDS-PAGE,e inmunotransferencia se realizaron como se describió usando el conjunto de detección de ECL Se usaron el anticuerpo de péptido anti-BCATc de rata purificado por inmunoafinidad (1 1 000) y el anticuerpo anti-BCATm humano

Figura 4 La influencia de la gabapentina (GBP) y los aminoácidos de cadena ramificada sobre la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el glutamato más glutamina por retinas *ex vivo* Se incubaron semiretinas a 37°C en condiciones estándar con $H^{14}CO_3$ a 25 mM y piruvato a 0,2 mM durante 20 minutos En algunos casos la gabapentina (a 1 mM) se incluyó en el medio de

142
470
505

incubación y en otros se incluyo GBP (a 1 mM) más los tres aminoácidos de cadena ramificada (a 0,2 mM) Los valores mostrados son medios ± SEM de HCO_3 incorporado en glutamato más glutamina en 20 minutos (n=4, * p<0,001, ** p<0,01) Abreviaturas gln+glu = suma de glutamina etiquetada más glutamato

Figura 5 Influencia de la concentración de la gabapentina (GBP) en la incorporación de $H^{14}CO_3$ en glutamato y glutamina en retinas ex vivo Las condiciones fueron similares a aquellas de la Figura 4, salvo por la concentración de la GBP Los valores mostrados son medios ± SEM (n=6-7, * p<0,05) Abreviaturas GLN+GLU = suma de glutamina más glutamato, LACT+TCA = suma de lactato más intermedios del ciclo de TCA

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al descubrimiento de que la inyección intraocular de glutamato produce la pérdida de células ganglionares que está relacionada con las primeras etapas de la retinopatía diabética (Vorwerk et al, IOVS 37 1618-1624 (1996)) y de que un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada, tal como la gabapentina por ejemplo, es efectivo

en la inhibición de la síntesis del glutamato, previniendo así la retinopatía diabética Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatía diabética, que incluye el tratamiento de la etapa de retinopatía prediabética, la etapa de la retinopatia diabética no proliferativa y la etapa de la retinopatía diabética proliferativa Por "profiláctico" se entiende la protección, total o parcial, de la retinopatía diabética, en particular el edema macular diabétic Por "terapeutico" se entiende el mejoramiento de la retinopatía diabética, propiamente dicha, y la protección, total o parcial, de otra retinopatia diabética, en particular el edema macular diabético

El método comprende la administración de un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada, en una cantidad suficiente para tratar la retinopatia en forma profiláctica o terapéutica Cualquier inhibidor de la via de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada puede ser usado en el método de la presente invención en la medida en que sea seguro y eficaz En la presente invención, "inhibidor de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT)" se usa para referirse a tales compuestos y ha de abarcar todos los compuestos que afectan la vía de la

aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada en alguno o todos los puntos en la via

Preferentemente, el inhibidor de la BCAT es un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, descriptas anteriormente, o un análogo que inhibe la vía de la BCAT o una prodroga de él, o una sal, éster, o amida farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes

A menos que se indique lo contrario, nos adherimos a las siguientes definiciones en toda la invencion

"Alquilo" significa un radical de hidrocarburo recto o ramificado que tiene de 1 a 10 atomos de carbono (a menos que se indique lo contrario) e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, y similares
"Halógeno" incluye fluor, cloro, bromo y yodo
"Alquenilo" significa radicales de hidrocarburo recto y ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y una unión doble e incluye etenilo, 3-buten-1-ilo, 2-etenilbutilo, 3-hexen-1-ilo y similares

"Alquinilo" significa radicales de hidrocarburo recto y ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y una unión

triple e incluye etinilo, 3-butin-1-ilo, propinilo, 2-butin-1-ilo, 3-pentin-1-ilo y similares

"Cicloalquilo" significa un grupo hidrocarbilo monocíclico o policíclico tal como ciclopropilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, ciclobutilo, adamantilo, norpinanilo, decalinilo, norbonilo, ciclohexilo, y ciclopentilo Tales grupos pueden ser sustituidos con grupos tales como hidroxi, ceto y similares También están incluidos los anillos en los cuales 1 a 3 heteroátomos reemplazan carbonos Tales grupos se denominan "heterociclo", que significa un grupo cicloalquilo que también lleva al menos un heteroátomo seleccionado de O, S, o NR_2, cuyos ejemplos son oxiranilo, pirrolidinilo, piperidilo, tetrahidropirano, piperazinilo, acilpiperazinilo, pirrolidinilo y morfolina, sustituidos o no sustituidos

"Alcoxi" se refiere a los grupos alquilo mencionados anteriormente unidos a través de oxígeno, cuyos ejemplos incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi, terc-butoxi y similares Además, alcoxi se refiere a poliéteres tales como $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$ y similares

Los grupos "alcanoilo" son alquilo unidos a través de un carbonilo, es decir $C_1-C_5-C(O)-$ Tales grupos incluyen formilo, acetilo, pripionilo, butirilo e isobutirilo

AAG
4230
509

"Acilo" significa un grupo alquilo o arilo (Ar) unido a través de un grupo carbonilo, es decir, R-C(O)- Por ejemplo, acilo incluye un alcanoilo de C_1-C_6, que incluye alcanoilo sustituido, en donde la porción de alquilo puede ser sustituida por NR^4R^5 o un grupo carboxílico o heterocíclico Los grupos acilo típicos incluyen acetilo, benzoilo y similares

Los grupos alquilo, alquenilo, alcoxi, y alquinilo descriptos anteriormente son optativamente sustituidos, preferentemente por 1 a 3 grupos seleccionados de NR^4R^5, fenilo, fenilo sustituido, tio alquilo de C_1-C_6, alcoxi de C_1-C_6, hidroxi, carboxi, alcoxicarbonilo de C_1-C_6, halo, nitrilo, cicloalquilo, y un anillo carbocíclico de 5 ó 6 miembros que tiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, nitrógeno sustituido, oxigeno y azufre "Nitrógeno sustituido" significa un nitrógeno que lleva alquilo de C_1-C_6 o $(CH_2)_nPh$ en donde n es 1, 2 ó 3 La sustitución con perhalo y polihalo también está contemplada

Ejemplos de grupos alquilo sustituidos incluyen 2-aminoetilo, pentacloroetilo, trifluorometilo, 2-dietilaminoetilo, 2-dimetilaminopropilo, etoxicarbonilmetilo, 3-fenilbutilo, metanilsulfanilmetilo, metoximetilo, 3-hidroxipentilo, 2-

carboxıbutılo, 4-clorobutılo, 3-cıclopropılpropılo, pentafluoroetılo, 3-morfolınopropılo, pıperazınılmetılo, y 2-(4-metılpıperazınıl)etılo

Ejemplos de grupos alquınılo sustıtuıdos ıncluyen 2-metoxıetınılo, 2-etılsulfanıletınılo, 4-(1-pıperazınıl)-3-(butınılo), 3-fenıl-5-hexınılo, 3-dıetılamıno-3-butınılo, 4-cloro-3-butınılo, 4-cıclobutıl-4-hexenılo, y sımılares

Los grupos alcoxı sustıtuıdos típicos ıncluyen amınometoxı, trıfluorometoxı, 2-dıetılaminoetoxı, 2-etoxıcarboniletoxı, 3-hıdroxıpropoxı, 6-carboxıhexıloxı, y sımılares

Además, los ejemplos de grupos alquılo, alquenılo y alquınılo sustıtuıdos ıncluyen dımetılaminometılo, carboximetılo, 4-dımetılamıno-3-buten-1-ılo, 5-etılmetılamıno-3-pentın-1-ılo, 4-morfolınobutılo, 4-tetrahıdropırınıdılbutılo, 3-ımıdazolıdın-1-ılpropılo, 4-tetrahıdrotıazol-3-ıl-butılo, fenılmetılo, 3-clorofenılmetılo y sımılares

Los términos "Ar" y "arılo" se refıeren a grupos aromáticos no sustıtuıdos y sustıtuıdos Los grupos heteroarılo tıenen de 4 a 9 átomos de carbono, de 1 a 4 de los cuales se seleccıonan ındependıentemente del grupo formado por O, S y N Los grupos heteroarílo tıenen 1 o 2 heteroatomos en un anıllo aromático

de 5 o 6 miembros Los sistemas de anillos aromáticos mono y bicíclicos están incluidos en la definición de arilo y heteroarilo Los grupos arilo y heteroarilo típicos incluyen fenilo, 3-clorofenilo, 2,6-dibromofenilo, piridilo, 3-metilpiridilo, benzotienilo, 2,4,6-tribromofenilo, 4-etilbenzotienilo, furanilo, 3,4-dietilfuranilo, naftilo, 4,7-dicloronaftilo, pirrol, pirazol, imidazol, tiazol, y similares

Los grupos Ar preferidos son fenilo y fenilo sustituido por 1, 2, o 3 grupos seleccionados independientemente del grupo formado por grupos alquilo, alcoxi, tio, tioalquilo, hidroxi, carbonilo, amino de la fórmula $-NR^4R^5$, y $T(CH_2)_mQR^4$ o $T(CH_2)_mCO_2R^4$ en donde m es de 1 a 6, T es O, S, NR^4, $N(O)R^4$, NR^4R^6Y, o CR^4R^5, Q es O, S, NR^5, $N(O)R^5$, o NR^5R^6Y en donde R^4 y R^5 son los descriptos anteriormente, y R^7 es alquilo o alquilo sustituido, por ejemplo, metilo, tricloroetilo, difenilmetilo, y similares Los grupos alquilo y alcoxi pueden ser sustituidos como se definió anteriormente Por ejemplo, los grupos típicos son carboxialquilo, alcoxicarbonilalquilo, hidroxialquilo, hidroxialcoxi, y alcoxialquilo

El símbolo "-" significa una unión

El término "paciente" significa todos los animales incluyendo los humanos Ejemplos de pacientes incluyen humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas En general, las formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas, son equivalentes a las formas no solvatadas y han de ser abarcados dentro del alcance de la presente invención

Ciertos compuestos de la presente invencion poseen uno o más centros quirales y cada centro puede existir en la configuración R(D) o S(L) La presente invención incluye todas las formas enantioméricas asi como las mezclas apropiadas de ellas

Los compuestos de las Fórmulas I, II y III son capaces de formar además análogos farmacéuticamente aceptables que comprenden sales, ésteres, amidas y prodrogas Como se usa en la presente invención, el término "sales, ésteres, amidas y prodrogas farmacéuticamente aceptables' se refiere a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas y prodrogas de los compuestos de la presente invención que son, a juicio del médico, adecuados para su uso

425
513

en contacto con los tejidos de los pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida, y similares, conmensurable con una relación riesgo/beneficio razonable y efectivos para el uso para el cual están destinados, así como las formas zwiteriónicas, cuando son posibles, de los compuestos de la invención El término "sales" se refiere a las sales de adición ácidas inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención Estas ales pueden prepararse en el lugar durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o mediante la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorganico adecuado y el aislamiento de la sal así formada y que incluye, en forma no taxativa, las sales de adición ácidas y/o básicas, solventes, N-óxidos de un compuesto de las Fórmulas I, II y III Esta invencion también proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de las Formulas I, II o III junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de ellos La totalidad de estas formas están dentro de la presente invención

Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las Fórmulas I, II y III incluyen sales derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, nitrico, fosfórico, sulfurico, bromhídrico, yodhídrico,

fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como los ácidos mono o dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxi alcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromaticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc Tales sales entonces incluyen sulfato, pirosulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monhidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencensulfonato, toluensulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato, y similares También están contempladas las sales de aminoácidos tales como arginato, gluconato, galacturonato, y similares, ver, por ejemplo, Berge et al, "Sales Farmaceuticas", *J of Pharmaceutical Science*, 1977,66 1-19

Las sales de adición ácidas de los compuestos básicos se preparan poniendo a la forma de base libre en contacto con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal en la forma convencional La forma de base libre puede ser regenerada poniendo a la forma de sal en contacto con una base y aislando a la base libre en la forma convencional Las

formas de base libre difieren algo de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en solventes polares, pero de lo contrario las sales son equivalentes a su respectiva base libre para los propósitos de la presente invención

Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, o aminas orgánicas Ejemplos de los metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares Los ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaina, ver, por ejemplo, Berge et al, mencionado anteriormente

Las sales de adición básicas de compuestos ácidos, se preperan poniendo en contacto la forma ácida libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal en la forma convencional La forma ácida libre puede regenerarse poniendo a la forma de sal en contacto con un ácido y aislando el ácido libre en una forma convencional Las formas ácidas libres difieren algo de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en solventes polares, pero de lo contrario las sales son equivalentes a sus

A53

~~420~~ 516

respectivo ácido libre para los propósitos de la presente invención

Los ejemplos de ésteres no tóxicos, farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen los ésteres de alquilo de C_1-C_6 en donde el grupo alquilo es una cadena recta o ramificada Los ésteres aceptables también incluyen los ésteres de cicloalquilo de C_1-C_5 así como los ésteres de arilalquilo tales como, en forma no taxativa, bencilo Los ésteres de alquilo de C_1-C_4 son preferidos Los esteres de los compuestos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales

Los ejemplos de amidas no tóxicas, farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen amidas derivadas de amoníaco, aminas primarias de alquilo de C_1-C_6 y dialquilaminas de C_1-C_6 secundarias en donde los grupos alquilo son cadenas rectas o ramificadas En el caso de las aminas secundarias, la amina también puede estar en la forma de un heterociclo de 5 o 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno Las amidas derivadas de amoníaco, aminas primarias de alquilo de C_1-C_3 y aminas secundarias de dialquilo de C_1-C_2 son preferidas Las amidas de los compuestos de la invención pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales

El término "prodroga" se refiere a compuestos que seon transformados rápidamente en vivo para dar el compuesto parental de las Formulas precedentes, por ejemplo, por hidrólisis en sangre Se proporciona una discusión completa en T Higuchi y V Stella, "Prodrogas como Sistemas de Suministro Novedosos', Vol 14 de la A C S Symposium Series, y en Portadores Bioreversibles en el Diseño de Drogas, ed Edward B Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987 ambas incorporadas en la presente invención como referencia En general, una prodroga es una droga que ha sido modificada químicamente y puede ser biológicamente inactiva en su lugar de acción, pero que puede ser degradada o modificada por uno o más procesos enzimáticos u otros procesos en vivo hacia la forma bioactiva parental en vivo

Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de un compuesto de las Fórmulas I, II o III, que cuando se administra a un paciente, mejora un síntoma de la enfermedad

El inhibidor de la BCAT, que es preferentemente un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, un análogo que inhibe la vía de la BCAT de las Formulas I, II y/o III, una prodroga que inhibe la vía de la BCAT de las Fórmulas I, II y/o III, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes, puede administrarse de acuerdo con el metodo de la presente

155

430
518

invención mediante cualquier vía Las vías de administración adecuadas incluyen la vía sistémica, tal como oral o de inyección , tópica, intraocular, periocular (por ejemplo, subTenon's), subconjuntiva, subretinal, supracoroidal y retrobulbar La forma en que se administra el inhibidor de la BCAT depende, en parte, de si el tratamiento de la retinopatia es profiláctico o terapéutico La forma en que se administra el inhibidor de la BCAT para el tratamiento terapéutico de la retinopatía depende, en parte, de la causa de la retinopatia

Por ejemplo, dado que la diabetes es la principal causa de la retinopatía, el inhibidor de la BCAT puede administrarse profilácticamente tan pronto como se detecta el estado de retinopatía prediabética Para el tratamiento profiláctico de la retinopatía que puede derivar de la diabetes, el inhibidor de la BCAT preferentemente se administra en forma sistémica, por ejemplo, por via oral o de inyección Para el tratamiento terapéutico de la retinopatía diabética no proliferativa, el inhibidor de la BCAT puede administrarse en forma sistémica, por ejemplo por vía oral o de inyección, o intraocular La retinopatía diabética proliferativa puede ser tratada terapéuticamente mediante la administración del inhibidor de la BCAT por vía intraocular, tópica, subconjuntiva o periocular (por ejemplo subTen's), por ejemplo Preferentemente, el inhibidor de la BCAT se administra por

456

430
519

vía intraocular, tópica, subconjuntiva o periocular (por ejemplo, subTenon's) para el tratamiento profiláctivo, o terapéutico de la retinopatía, antes, durante o después de la extracción quirurgica de un tejido cicatrizado de un ojo, generado durante la neovascularización durante la etapa diabética proliferativa

El inhibidor de la BCAT preferentemente se administra tan pronto como es posible despues de que se ha determinado que un animal, tal como un mamifero, específicamente un humano, está en riesgo de retinopatía (tratamiento profiláctico) o ha comenzado a desarrollar retinopatia (tratamiento terapéutico) El tratamiento depende, en parte, del inhibidor de la BCAT particular que se use, de la cantidad del inhibidor de la BCAT administrada, de la vía de administración, y de la causa y medida, si hubiera, de la retinopatía desarrollada

Un conocedor del arte apreciará que los métodos adecuados para administrar un inhibidor de la BCAT, que es útil en el método de la presente invención, están disponibles Aunque se puede utilizar más de una vía para administrar un inhibidor de la BCAT particular, una via particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía Por consiguiente las vias de administración descriptas son simplemente ejemplos y no son de ningún modo taxativas

A57
432
520

La dosis administrada a un animal, particularmente un humano, de acuerdo con la presente invención, debe ser suficiente para producir la respuesta deseada en el animal en un marco de tiempo razonable Un experto en el arte reconocerá que la dosificación depende de una variedad de factores, que incluyen la resistencia del inhibidor de la BCAT particular empleado, la edad, la especie, la condición y el estado de la enfermedad, y el peso corporal del animal, asi como la cantidad de la retina que está a punto de ser afectada o que está afectada realmente por la retinopatía El tamaño de la dosis también será determinado por la via, el ritmo y la frecuencia de la administración así como la existencia, naturaleza y nivel de cualquier efecto colateral adverso que pueda acompañar a la administración de un inhibidor de la BCAT particular y el efecto fisiológico deseado Un experto en el arte apreciará que diversas condiciones o estados de enfermedad, en particular, condiciones o estados de enfermedad crónicos, pueden requerir un tratamiento prolongado que consiste en múltiples administraciones

Las dosis y los regímenes de dosificación pueden ser determinados por técnicas convencionales que hallan la gama conocidas para los expertos en el arte En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son

433
521

inferiores a la dosis óptima del compuesto Luego, la dosificación es aumentada en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo segun las circunstancias El método de la presente invención típicamente consiste en la administración de 1 mg/kg/día a 100 mg/kg/dia, preferentemente de 15 mg/kg/día a 50 mg/kg/día , si se administra en forma sistémica La administración intraocular típicamente consiste en la administración de 0,1 mg a 5 mg en total, preferentemente de 0,5 mg en total a 1 mg en total Una concentración preferida para la administración tópica es de 100 mu M

Las composiciones para su uso en el método de la presente invención preferentemente comprenden un portador farmaceuticamente aceptable y una cantidad de un inhibidor de la BCAT suficiente para tratar la retinopatía en forma profiláctica o terapéutica El portador puede ser cualquiera de aquellos que se usan convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones físicoquímicas, tales como la solubilidad y la falta de reactividad con el compuesto, y por la vía de administración Un conocedor ordinario del arte apreciará que, ademas de las siguientes composiciones farmacéuticas descriptas, el inhibidor de la BCAT puede formularse como composiciones poliméricas, complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina,

199
434
522

liposomas, microesferas, microcápsulas y similares (ver, por ejemplo, las Patentse Estadounidenses Nos 4 997 652, 5 185 152 y 5 718 922)

El inhibidor de la BCAT puede formularse como una sal de adición farmacéuticamente aceptable Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables para su uso en la cmp farmacéutica incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nitrico, y sulfúrico, y de los ácidos orgánicos, tales como ácido tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluensulfónico

Los excipientes farmacéuticamente aceptables descriptos en la presente invención, por ejemplo, vehiculos, coadyuvantes, portadores o diluyentes, son conocidos para los expertos en el arte y el publico puede conseguirlos fácilmente Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea quimicamente inerte para el inhibidor de la BCAT y uno que no tenga efectos colaterales perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso

La elección del excipiente será determinada en parte por el inhibidor de la BCAT particular, asi como por el método

700
435
523

particular usado para administrar la composición Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención Las siguientes formulaciones son simplemente ejemplos y de ninguna manera son taxativas

Las formulaciones inyectables están entre aquellas preferidas de acuerdo con el método de la presente invención Los requerimientos para los portadores farmacéuticamente efectivos para las composiciones inyectables son conocidos por los expertos en el arte (ver Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J B Lippincott Co , Philadelphia, Pa , Banker and Chalmers, eds , páginas 238-250 (1982), y Manual de la ASHP sobre Drogas Inyectables, Toissel, 4ª ed , páginas 622-630 (1986)) Se prefiere que tales composiciones inyectables se administren por vía intramuscular, intravenosa o intraperitoneal

Las formulaciones tópicas son conocidas para los expertos en el arte Tales formulaciones son adecuadas en el contexto de la presente invención para la aplicación a la piel El uso de parches, protectores corneales (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 185 152) y de soluciones oftálmicas (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 7210 182) y de ungüentos, por ejemplo, gotas oculares, está también dentro de la pericia del arte

461

436
524

Las formulaciones adecuadas para la administración oral comprenden (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina, o jugo de naranja, (b) cápsulas, tabletas, grageas, que contienen cada una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos, (c) polvos, (d) suspensiones en un líquido apropiado, y (e) emulsiones adecuadas Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin el agregado de un agente tensoactivo, agente de suspensión, o agente emulsionador farmacéuticamente aceptable Las formas de cápsulas pueden ser del tipo ordinario de gelatina con recubrimiento duro o blando que contienen, por ejemplo, agentes tensoactivos, lubricantes, rellenos inertes, tales como lactosa, sucrosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz Las formas de tabletas pueden incluir uno o más de lactosa, sucrosa, manitol, almidón de maíz, almidón de papa, ácido alginico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, sodio de croscomelosa, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido estárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampones, agentes desintegrantes, agentes humectantes,

conservantes, agentes saborizantes, y excipientes farmacéuticamente compatibles Las formas de grageas pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, generalmente sucrosa y acacia o tragacanto así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sucrosa y acacia, emulsiones, geles, y similares que contienen, además del ingrediente activo, aquellos excipientes que con conocidos en el arte

La efectividad de una droga administrada oralmente depende del transporte eficinete de la droga a través del epitelio de la mucosa y de su estabilidad en la circulación enterohepática Las drogas que son efectivas después de la administración parenteral pero menos efectivas por la vía oral, o cuya semivida en el plasma se considera demasiado corta, pueden ser quimicamente modificadas en una forma de prodroga

La formulación adecuada para la administración parenteral incluye soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor al cual está destinada, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y conservantes El inhibidor puede

163
438
526

administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un liquido esteril o una mezcla de líquidos, que incluyen agua, solucion salina, dextrosa acuosa y soluciones de azucares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol, o alcohol hexadecílico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, sulfóxido de dimetilo, cetales de glicerol, tales como 2,2,-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster o glicérido de ácido graso, o un glicérido de ácido graso acetilado, con o sin el agregado de un agente tensoactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionadores y otros coadyuvantes farmacéuticos Los aceites, que pueden usarse en formulaciones parenterales incluyen petróleo, aceites animales, vegetales o sintéticas Ejemplos especificos de aceites incluyen aceite de maní, de soja, de sesamo, de semilla de algodón, de maíz, de oliva, de petrolato y mineral

Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos

439
527

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio, y trietanolamonio, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, y haluros de alquil piperidinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasos, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno polioxipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-p-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de ellos

Las formulaciones parenterales típicamente contienen un 0,5% a 25% en peso del ingrediente activo en solución Se pueden usar conservantes y tampones Para minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la infección, tales composiciones pueden contener uno o más agentes tensoactivos no ionicos que tienen un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de 12 a 17

La cantidad del agente tensoactivo en tales formulaciones típicamente está en la gama del 5% al 15% en peso Los agentes

~~440~~
528

tensoactivos adecuados incluyen los ésteres de ácido graso de polietilen sorbitan, tales como monooleato de sorbitan y los agregados de peso molecular alto de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol Las formulaciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y tubos, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente el agregado del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para las inyecciones, inmediatamente antes del uso Las soluciones y suspensiones para inyecciones extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles de la clase descripta anteriormente

Tales composiciones pueden formularse como formulaciones intraoculares, formulaciones de liberación sostenida o dispositivos (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 378 475) Por ejemplo, se puede usar gelatina, sulfato de condroitina, un polifosfoéster, tal como bis-2-hidroxietil-tereftalato (BHET), o un ácido poliláctico-glicólico (en diversas proporciones), para formular formulaciones de liberación sostenida Los implantes (ver, por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos 5 443 505 5 853 224 y 4 997 652), dispositivos (ver, por ejemplo, las Patentes

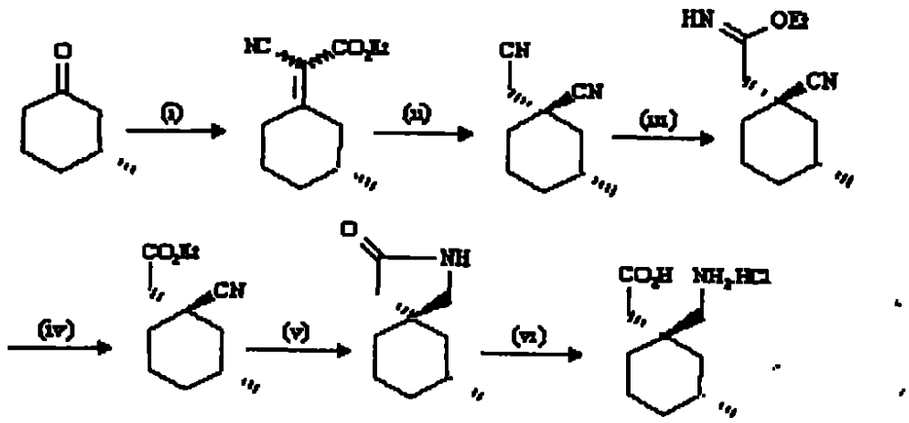
Estadounidenses Nos 5 554 187, 4 863 457, 5 098 443 y 5 725 493), tales como un dispositivo implantable, por ejemplo, un depósito mecánico, un dispositivo intraocular o un dispositivo extraocular con un conducto intraocular (por ejemplo, de 100 mu a 1 mm de diámetro), o un implante o un dispositivo compuesto por una composición polimérica como las descriptas anteriormente

El método de la presente invención puede también consistir en la co-administración de otros compuestos farmacéuticamente activos Por "co-administracion" se entiende la administración antes, simultáneamente con, por ejemplo en combinación con el inhibidor de la BCAT en la misma formulación o en formulaciones separadas, o después de la administración de un inhibidor de la BCAT como los descriptos anteriormente Por ejemplo, los corticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona, o triamcinalona acetinida, o compuestos antiinflamatorios que no contienen corticosteroides, tales como ibuprofeno o flubiprobeno, pueden ser así co-administrados En forma similar, las vitaminas y minerales, por ejemplo, zinc, antioxidantes, por ejemplo carotenoides (tales como zeaxantina o luteína) y los micronutrientes pueden ser co-administrados

167
442
530

Esquemas sintéticos generales para preparar compuestos de las Fórmulas I-IV

EJEMPLO 1 Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Tolueno, 120°C

(ii) a NaCN, EtH (95%), H_2O, 115°C, b HCl(g)

(iii) EtOH, HCl(g), Tolueno

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2, $EtOH/NH_3$, Ni Raney, 30°C-35°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Paso i Etil éster del ácido 2-ciano-((R)-3-metil-ciclohexilideno)-acetico

Una mezcla de 3-(R)-metilciclohexanona (125 mmol), cianoacetato de etilo (124 mmol), acetato de amonio (12,5 mmol) y ácido acético glacial (24 mmol) se refluyeron con una trampa de Dean Stark durante 24 horas La mezcla se enfrió y se lavó con H_2O Los lavados con H_2O se extrajeron con tolueno Los extractos de tolueno se combinaron con la capa orgánica original, se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron con un solvente El aceite crudo se purificó mediante destilación de Kugelrohr para dar un aceite (Temperatura del horno de punto de ebullición 150°C-160°C) Rendimiento del 86%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,01-1,05 (3H, m), 1,17-1,32 (1H, m), 1,35 (3H, t, J=7 Hz), 1,42-2,30 (6H, m), 2,98 (1H, d, J=13 Hz), 3,74 (1H, d, J=13 Hz), 4,27 (2H, q, J=7 Hz)

MS (CI) m/z 208 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{17}NO_2$ Calculado C 69,54 H 8,27 N 6,76

Hallado C 69,44 H 8,22 N 6,76

Paso ii trans-(1R,3R)-1-Cianometil-3-metil-ciclohexanocarbonitrilo

A una solución de NaCN (40 mmol) en 6 ml de H_2 y 160 ml de etanol (95%), se agregó etil éster del ácido 2-ciano((R)-3-metil-cicloehxilideno)-acético (40 mmol) Pasadas 22 horas en reflujo la solución enfriada se filtro, el filtrado se acidificó con HCl gaseoso y se filtró nuevamente El solvente

169
444
532

y el aceite crudo se purificó mediante cromatografía de columna para dar un sólido cristalino de color amarillo pálido Rendimiento del 88%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,90 (1H, m), 0,98 (3H, d, J=6 Hz), 1,11 (1H, t, J=12 Hz), 1,38 (1H, dt, J=4, 9 Hz), 1,60-1,90 (4H, m), 2,07 (2H, m), 2,68 (2H, s)

MS (CI) m/z 163 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{14}N_2$ Calculado C 74,04 H 8,70 N 17,27

Hallado C 69,44 H 8,71 N 17,25

Paso iii Etil éster del ácido trans-2-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acetimídico

A una solucion de trans-(1R,3R)-1-cianometil-3-metil-ciclohexanocarbonitrilo (6,2 mmol) en 30 ml, etanol (absoluto) se agregaron 30 ml de tolueno seco La solución se enfrio en hielo mientras se la saturaba con HCl gaseoso La solución detenida fue dejada en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas El solvente se removio y el residuo sólido se trituró con dietil éter para obtener un precipitado que se secó para dar un sólido cristalino Rendimiento 50%

Punto de fusión 118°C-120°C

445
533

^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 0,8-0,89 (1H, m), 0,91 (3H, d, J=6,3 Hz), 1,06-1,12 (1H, m), 1,24-1,35 (1H, m), 1,37 (3H, t, J=7 Hz), 1,41-1,95 (6H, m), 3,02 (2H, s), 4,49 (2H, q, J=7 Hz)

MS (CI) m/z 195 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1,08M HCl Calculado C 58,19 H 8,58 N 11,31

Hallado 58,25 H 8,59 N 11,59

Paso iv Etil éster del ácido trans-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acético

Etil éster del ácido trans-2-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acetimídico (1,1 mmol) se disolvió en H_2O helada (40 ml) y el pH se ajustó con HCl 1 N a pH 1,5 La solución se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas Se agregó acetato de etilo (30 ml) y la capa orgánica se lavó con H_2O, se secó y el solvente se removió para dejar un aceite claro

Rendimiento 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,78-0,90 (1H, m), 0,93 (3H, d, J=6 Hz), 0,97-1,0 (1H, m), 1,23-1,25 (1H, m), 1,29 (3H, t, 7,2 Hz), 1,57-1,80 (4H, m), 2,05-2,08 (2H, Br t), 2,54 (2H, s), 4,20 (2H, q, J=7,2 Hz)

MS (CI) m/z 210 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{19}NO_2$ Calculado C 68,87 H 9,15 N 6,69

Hallado C 68,87 H 9,11 N 6,90

446
534

Paso v trans-(5R,7R)-7-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona

Etil éster del ácido trans-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acético (8,9 mmol) se disolvió en NH_3/EtOH (7%, 40 ml) junto con Níquel Raney prelavado (con H_2O seguida por EtOH) en un matraz de Parr de 250 ml La solución se hidrogenó a 30°C, 46 psi durante 24 horas La solución enfriada se filtró a través de un tapón de celita, lavando acetato de etilo El solvente se removio del filtrado para dejar un sólido blanco
Rendimiento 30%
Punto de fusión 92°C-98°C
^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 0,75-0,82 (1H, m), 0,84 (3H, d, J=6,4 Hz), 0,88-0,94 (1H, m), 1,14-1,19 (1H, m), 1,20-1,50 (2H, m), 1,50-1,63 (4H, m), 1,91 (2H, s), 3,08 (2H, s), 7,42 (1H, s)
MS (CI) m/z 168 (MH^+)
Análisis $C_{10}H_{17}NO$ Calculado C 71,81 H 10,25 N 8,37
Hallado C 71,80 H 10,29 N 8,31

Paso vi Clorhidrató del acido trans-((1R,3R)-1-aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético

trans-(5R,7R)-7-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (2,17 mmol) se disolvió en una solución de HCl a 10 M (5 ml) y H_2O (5 ml) y la mezcla se refluyo a aproximadamente 140°C durante 5 horas La solución enfriada se diluyó con 10 ml de H_2O y 10 ml de DCM

y la capa acuosa se lavó nuevamente con 2x15 ml de DCM La capa acuosa se redujo luego hasta secarse para dejar un sólido blanco Rendimiento 76%

Punto de fusión 148°C-155°C $[\alpha]_D$ = -2,5 (T=20°C, c=1, MeOH)

Un isómero (RR)

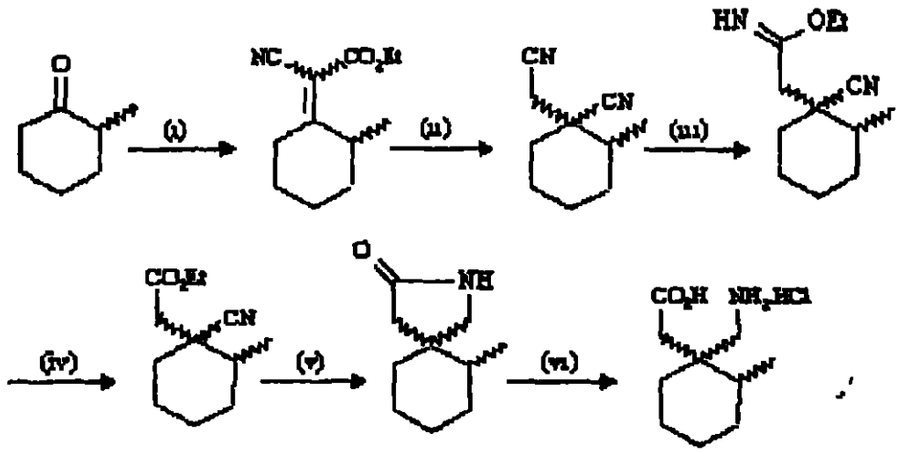
^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,69-0,79 (1H, m), 0,82 (3H, d, J=6 Hz), 0,87-0,90 (1H, m), 1,12-1,20 (1H, dt, J=4,5, 13,3 Hz), 1,34-1,50 (3H, m), 1,60-1,63 (3H, m), 2,30 (2H, s), 3,01 (2H, s), 7,93 (3H, Br s)

MS (CI) m/z 186 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{19}NO_2$ 1,1 HCl Calculado C 53,29 H 8,99 N 6,21

Hallado C 53,23 H 8,99 N 6,45

EJEMPLO 2 Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético



(i) EtO_2OCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Tolueno, 120°C

(ii) a NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115°C, b HCl(g)

(iii) EtOH, HCl(g), Tolueno

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2, $EtOH/NH_3$, Níquel Raney, 30°C-50°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Paso i Etil éster del ácido 2-ciano-(2-metil-ciclohexilideno)-acético

(+/-)2-Metil ciclohexanona (80 mmol), etil cianoacetato (80 mmol), acetato de amonio (8 mmol) y ácido acético glacial (16 mmol) reaccionaron como en el método general (Ejemplo 1) paso 1 para dar un aceite claro Rendimiento del 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,23 (3H, dd, J=7, 10 Hz), 1,35 (3H, t, J=7 Hz), 1,55-1,82 (5H, m), 1,93-2,05 (1H, m), 2,17 (1H, dt, J=5, 14 Hz), 2,47 (1H, dt, J= 5, 9 Hz), 2,92-2,97 (1H, Br d, J= 15 Hz), 3,30-3,35 (1H m), 3,81-3,86 (1H, Br d, J=15 Hz), 4,06-4,14 (1H, m), 4,23-4,30 (3H, dq, J= 1, 6 Hz)

MS (CI) m/z 208 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{17}NO_2$ Calculado C 69,54 H 8,27 N 6,76

Hallado C 69,26 H 8,26 N 6,66

Paso ii 1-Cianometil-2-metil-ciclohexanocarbonitrilo

Etil éster del acido 2-ciano-(2-metil-ciclohexilideno)-acético (37 mmol), NaCN (37 mmol), reaccionaron como en el método general (Ejemplo 1), paso ii El sólido crudo se purificó mediante cromatografía de columna (3 1, heptano acetato de etilo), para dar un aceite claro Rendimeinto 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,06 (3H, d, J=6,8 Hz), 1,11 (1H, d, J=6,8 Hz), 1,20-2,20 (18H, m), 2,77 (2H, dd, J=16,8 Hz), 2,63 (2H, dd, J=16,8 Hz)

MS (CI) m/z 163 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{14}N_2$ Calculado C 73,49 H 8,69 N 16,86

Hallado C 73,24 H 8,73 N 17,08

Paso iii Etil ester del ácido 2-(1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acetimidico

1-Cianometil-2-metil-ciclohexanocarbonitrilo (7,3 mmol) reaccionó como en el método general (Ejemplo 1), Paso iii para dar un sólido blanco Rendimiento 70%

Punto de fusión 107°C-114°C

^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 1,00-1,06 (3H, 2xt, J=6,4 Hz), 1,10-1,38 (2H, m), 1,38 (3H, t, J=6,8 Hz), 1,40-2,10 (7H, m), 2,86, 2,92, 3,10, 3,28 (2H, 4xd, J=14, 14,4 Hz resp), 4,48 (2H, q, J=6,8 Hz)

MS (CI) m/z 209 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1,06 HCl Calculado C 58,37 H 8,60 N 11,347

Hallado C 58,15 H 8,63 N 11,60

Paso iv Etil éster del ácido (1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acético

Etil éster del ácido 2-(1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acetimidico (4,1 mmol) reaccionó como en el método general (Ejemplo 1) paso (iv) para dar un aceite claro Rendimiento 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,03, 1,090 (3H, 2xd, J=7 Hz), 1,27-1,30 (3H, m), 1,32-2,00 (8H, m), 2,10-2,20 (1H, m), 2,44, 2,82 (3H, 2xd, J=14,8 Hz), 2,54 (1H, m), 4,16-4,22 (2H, m)

MS (CI) m/z 210 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{19}NO_2$ Calculado C 68,87 H 9,15 N 6,69

Hallado C 68,84 H 9,13 N 6,75

Paso v 6-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona

Etil éster del ácido (1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acético (8,4 mmol) reaccionó como en el metodo general (Ejemplo 1) Paso (v) durante 24 horas a 10°C, 50 psi El aceite crudo se purificó mediante cromatografía de columna (acetato de etilo), para dar un sólido blanco Rendimiento 34%

Punto de fusión 85°C-90°C

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,88-0,91 (3H, dd, J=6,8 Hz), 1,41-1,78 (9H, m), 2,00-2,30 (2H, m), 3,06-3,23 (2H, m), 7,07 (1H, Br, s)

MS (CI) m/z 168 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{17}NO$ Calculado C 71,81 H 10,24 N 8,37

Hallado C 71,83 H 10,19 N 8,27

Paso vi Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético

6-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (2,5 mmol) reaccionó como en el método general (Ejemplo 1) paso vi para dar un sólido blanco Rendimiento 42%

Punto de fusión 108°C-110°C

$[\alpha]_D$= 0(T=20,5°C, C=1, MeOH) Dos diastereómeros 3 1

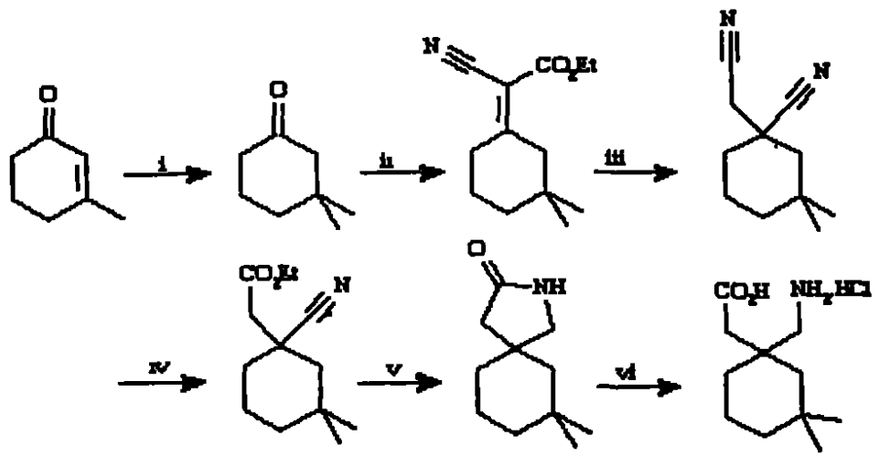
^{1}HNMR (DMSO = D_2O) 400 MHz δ 0,79, 0,85 (3H, 2xd, J=6,8 Hz), 1,21-1,65 (9H, m), 2,22, 2,43 (1H, 2xd, J=15 Hz), 2,46, 2,49 (1H, 2xd, J=15 Hz), 2,83-2,92 (1H, 2xd, J=3,6 Hz), 3,05, 3,15 (1H, 2xd, J=13,6 Hz)

MS (CI) m/z 186 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{19}NO_2$1,3HCl Calculado C 51,64 H 8,79 N 6,02

Hallado C 51,66 H 8,91 N 16,16

EJEMPLO 3 Clorhidrato del acido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético



i) CuI, MeLi, NH_4Cl, NH_3 (92%)

ii) $NCCH_2CO_2Et$, NH_4OAc, tolueno (83%)

iii) NaCN, EtOH, H_2O (57%)

iv) HCl, EtOH, tolueno (93%)

v) H_2, Ni Raney, EtOH NH_3 (84%)

vi) HCl, H_2O (64%)

Paso i 3,3-Dimetil-ciclohexanona

Sintetizada a través del método descripto por Pelletier, S W , Mody, N V , *J Org Chem* , 1976, 41, 1069

Una solución de dimetil cuprato de litio se preparó agregando metil litio (1,4 M en éter 77,25 ml, 2,45 mol) a yoduro de cobre (I) (8,8 g, 0,046 mol) bajo argón La solución se enfrió a 0°C, y se agregó 3-metil-ciclohexen-1-ona (5 ml, 0,044 mol) gota a gota, con agitación, y se formó un precipitado de color amarillo profundo La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante una hora antes de ser vertida en una solución de amoníaco acuoso (100 ml) y acetato de amonio (ca 5 g) Las capas se separaron y la capa acuosa se lavó con éter dietílico (3 x 50 ml) Los orgánicos combinados se lavaron con solución salina saturada (3 x 100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío para dejar un líquido de color amarillo oscuro

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,98 (6H, s), 1,59 (2H, m), 1,88 (2H, m), 2,14 (2H, m), 2,26 (2H, m)
IR (película) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2956, 1711 (C=O), 1457, 1368, 1292, 1226, 1076

Paso ii Etil éster del acido 2-ciano-5,5-dimetil-3-propil-hex-2-enoico

A una solución de 3,3-dimetilciclohexanona (4 g, 0,032 mol) en tolueno (25 ml), se agregó cianoacetato de etilo (3,37 ml, 0,032 mol, 1 eq), acetato de amonio (0,24 g, 0,003 mol, 0,1

454
542

eq), y ácido acético (0,36 ml, 0,006 mol, 0,2 eq) La solución de color amarillo se calentó a reflujo mientras se la unía a una trampa de Dean-Stark, y se continuó calentando hasta que ya no hubo agua condensada en la trampa Después d enfriar, la solución de color naranja se lavó con agua (3 x 25 ml) y la capa orgánica se secó ($MgSO_4$) La filtración y la remoción del solvente en vacío dieron el producto crudo como un líquido de color naranja profundo La purificación se logró mediante destilacion de Kugelrohr para dejar la mezcla de productos *cis* y *trans* como un liquido de color amarillo pálido, punto de ebullición 160°C-170°C, 4 mbar (5,83 g, 83%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,96, (6H, s, 2x Me), 1,34 (6H, m, 2x Me de ester), 1,49 (4H, m), 1,75 (2H, quin , J 6,4), 2,46 (2H, s), 2,60 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,80 (2H, s), 2,93 (2H, t, J=6,4 Hz), 4,27 (4H, m)

MS (CI) z/e 222 (M^++1)

IR (película) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2958, 2870, 2224 (CN), 1731 (C=O), 1606 (C=C), 1277, 1223

Análisis $C_{13}H_{19}O_2N$ Calculado C 70,56 H 8,65 N 6,32

Hallado C 70,35 H 8,79 N 6,25

Paso iii 1-Cianometil-3,3-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo

543
455

A una solución del etil ester del ácido 2-ciano-5,5-dimetil-3-propil-hex-2-enoico (1,26 g, 0,006 mol) en etanol (100 ml) y agua (4 ml) se agregó cianuro de sodio (0,28 g, 0,006 mol, 1 eq) La solución amarillenta se calentó a reflujo durante 8 horas y luego se enfrió, durante cuyo tiempo se formó un precipitado blancuzco

La suspensión se filtró bajo vacio y el filtrado se acidificó con gas de HCl hasta que el pH fue de aproximadamente 2 La mezcla luego se filtró una segunda vez y luego el solvente se removió en vacío para dejar el producto crudo como un solido de color verde pálido

La cromatografía de columna rapida, después de la adsorción del producto crudo sobre silice, eluyendo con 0%-50% de EtOAc en heptano, dio el binitrilo como un sólido incoloro (0,57 g, 57%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,99, (3H, s, Me), 1,13 (1H, td, J 13,2, 4,2), 1,21 (3H, s, Me), 1,32 (2H, m), 1,54 (1H, m), 1,82 (3H, m), 2,15 (1H, m), 2,65 (2H, s, CH_2CN)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 19,61, 25,17, 30,79, 31,18, 33,77 34,79, 35,37, 37,92,-46,26, 115,06, 122,19

MS (CI) z/e 177 (M^++1)

IR (pelicula) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 2988, 2937, 2237 (2x CN), 1749, 1456, 1423, 1369, 1202, 1180, 1031, 972

Análisis $C_{11}H_{16}N_2$ Calculado C 74,96 H 9,15 N 15,89

Hallado C 75,08 H 9,32 N 15,80

544
456

Paso iv, Etil éster del ácido (1-ciano-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético

1-Cianometil-3,3-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (0,50 g, 2,84 mmol) se disolvió en etanol absoluto (20 ml) a temperatura ambiente y luego se enfrió a 0°C Se agregó tolueno (20 ml) a la solución y luego la mezcla de la reacción se acidifico pasando gas de HCl a través de ella a una velocidad suave durante ca 45 minutos El matraz fue detenido luego y se lo dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas

La solución de color amarillo fue dividida entre el acetato de etilo y el agua y las capas se separaron La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x 30 ml) y los orgánicos combinados se lavaron con una solución de carbonato de hidrógeno de sodio saturado acuoso (3x 50 ml), solución salina (3x 50 ml), se secaron ($MgSO_4$) y el solvente se removió bajo presión reducida para dejar un líquido de color amarillo pálido (0,59 g, 93%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,94, (3H, s, Me), 1,16 (3H, m), 1,21 (3H, s, Me), 1,29 (3H, t, J 7,2, CH_2CH_3), 1,50 (1H, m), 1,65 (1H, dt, J 14,4, 7,6), 1,84 (1H, qt, J 13,3, 3,2), 1,96 (1H, dt, J 13,7, 2,2), 2,16 (1H, m), 2,48 (1H, d, J 15,6, C-2H), 2,54 (1H, d, J 15,6, C-2H), 4,20 (2H, q, J 7,2, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 14,21, 19,65, 25,42, 31,03, 34,04, 34,14, 36,08, 38,44, 46,14, 46,80, 61,02, 123,67, 169,00

MS (CI) z/e 224 (M^++1)

545 457

IR (película) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2998, 2937, 2868, 2234 (C=O), 1457, 1372, 1217, 1181, 1154, 1026

Análisis $C_{13}H_{21}NO_2$ Calculado C 69,92 H 9,48 N 6,27

Hallado C 69,63 H 9,45 N 6,15

Paso v 7,7-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona,

Etil éster del ácido (1-ciano-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético (0,5 g, 2,23 mmol) se hidrogenó en amoníaco etanólico (60 ml) con níquel Raney como catalizador (ca 0,25 g) a 50°C y 50 psi durante 48 horas

El catalizador luego fue removido por filtración a través de Celita, y el solvente fue removido en vacío para dejar un sólido cristalino de color verdoso

La cromatografía de columna rápida, eluyendo con 0%-100% de acetato de etilo en heptano, dio la lactama pura como un sólido incoloro (340 mg, 84%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,89, (3H, s, Me), 0,92 (3H, s, Me), 1,25 (2H, m), 1,36 (2H, m), 1,51 (3H, m), 1,68 (1H, s), 2,18 (1H, d, J 16,4, CH_2NH), 2,24 (1H, d, J 16,8, CH_2NH), 3,15 (2H, s, CH_2CO)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 19,16, 29,88, 30,36, 31,28, 36,57, 39,05, 39,61, 44,58, 49,54, 54,79, 17,72

MS (CI) z/e 182 (M^++1)

546 458

IR (película) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 3203, 3100 (NH), 2914, 2860, 1698 (C=O), 1486, 1374, 1317, 1289, 1257, 1076

Análisis $C_{11}H_{19}NO$ Calculado C 72,88 H 10,56 N 7,73

Hallado C 72,38 H 10,47 N 6,7,56

Paso vi Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acetico

7,7-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (0,3 g, 1,66 mmol) se disolvió en una mezcla de HCl (concentrado, 5 ml) y agua (5 ml), y la solución incolora resultante se calentó a reflujo durante 20 horas La solución se enfrió y luego fue dividida entre agua y diclorometano y las capas separaron La capa acuosa se lavó con diclorometano (3x 20 ml) y el agua/HCl se removió mediante evaporación rotativa para dejar el producto crudo como un sólido blancuzco La trituración de este sólido con acetato de etilo y la filtración del producto dio la sal de clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético como un sólido incoloro (140 mg, 42%, 64% basado en el material inicial recuperado)

^1H NMR (400 MHz, DMSO) 0,90, (3H, s, Me), 0,92 (3H, s, Me), 1,15-1,49 (8H, m), 2,45 (2H, s, CH_2CO_3H), 2,90 (2H, br q, J 13,5, CH_2NH_3), 7,96 (3H, br s, NH_3), 12,36 (1H, br s, OH)

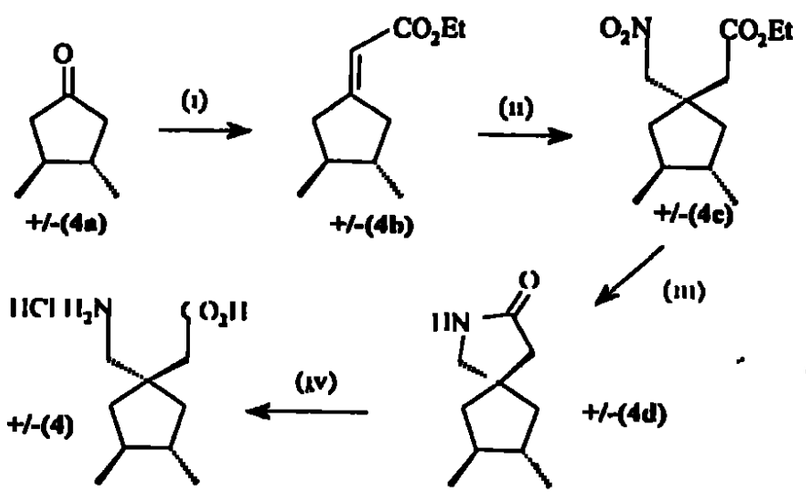
IR (película) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 2930, 1728 (C=O), 1272, 1123

547
459

Análisis $C_{11}H_{22}NO_2Cl$ Calculado C 56,04 H 9,41 N 5,94

Hallado C 55,79 H 9,61 N 6,23

EJEMPLO 4 Clorhidrato del acido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso i Síntesis del Etil éster del ácido (±)(trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (4b)

Se suspendió NaH (dispersión al 60% en aceite, 737 mg, 18,42 mmol), tetrahidrofurano seco (50 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (3,83 ml, 19,30 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Se agregó luego la cetona

548 -185-
460

(+/-)-(4a) (1,965 g, 17,54 mmol) en THF (10 ml) y se dejó calentar la mezcla a la temperatura ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase orgánica se separó, se lavó con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purifico mediante cromatografía rápida (silice, acetato de etilo heptano 1 9) para dar 3,01 g (94%) de (4b) como un aceite incoloro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,01, (3H, d, J=6 Hz), 1,03 (3H, d, J=6 Hz), 1,26 (3H, t, J=7 Hz), 1,49 (2H, m), 2,07 (1H, m), 2,24 (1H, m), 4,13 (2H, q, J= 7 Hz), 5,72 (1H, s)
MS (CI^+) m/e 183 (M+1)

Paso ii Síntesis del Etil éster del ácido (±)(trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acetico (4c)

Etil éster del ácido (±)(trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (4b) (2,95 g, 16,2 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se agitó a 70°C con nitrometano (1,9 ml, 35,2 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en tetrahidrofurano, 22 ml, 22,0 mmol) Pasadas 6 horas, lamezla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl 2N (30 ml) y luego con

549 461 426

solución salina (50 ml) La fase orgánica se recogió, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacio El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo, heptano 1,9) para dar 1,152 g (29%) de un aceite claro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J=6 Hz), 1,10-1,39 (5H, m), 1,47 (2H, m), 1,87 (1H, m), 2,03 (1H, m), 2,57 (2H, ABq, J = 16,38 Hz), 4,14 (2H, q, J= 7 Hz), 4,61 (2H, ABq, J = 12,60 Hz)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (película) v cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Paso iii Síntesis de la (±)-(trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 5]nonan-2-ona (4d)

El etil éster del ácido (±)-(trans)-(3,4-dimetil-1-nitrilometil-ciclopentil)-acetico (4c) (1,14 g, 4,7 mmol) se disolvió en metanol (50 ml) y se agitó sobre catalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrogeno (40 psi) a 30°C Pasadas 5 horas, el catalizador se removió por filtración a través de celita El solvente se removió en vacío para dar 746 mg (95%) de un aceite de color amarillo pálido que se solidificó en reposo

550
462

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J=6 Hz), 1,32 (2H, m), 1,46 (2H, m), 1,97 (2H, m), 2,27 (2H, ABq, J = 16,27 Hz), 3,23 (2H, s), 5,62 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 168 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1451, 1681, 1715, 2948, 3196

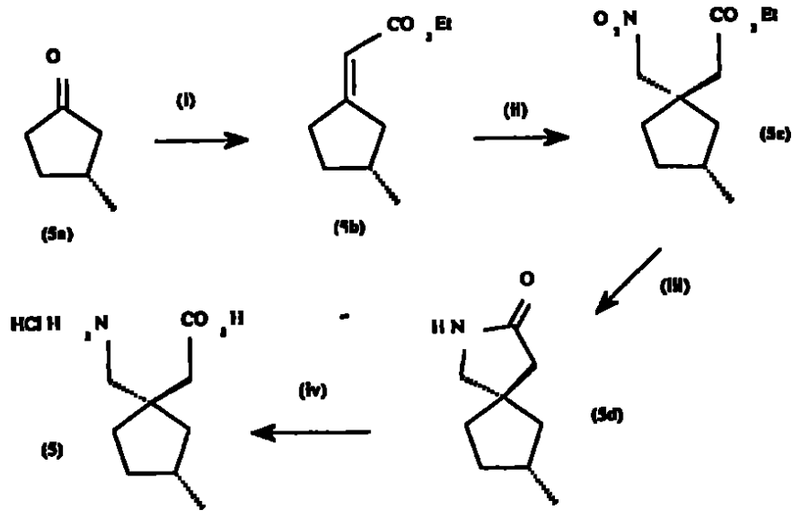
Paso iv, Síntesis del clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético

La (±)-(trans)-7,8-dimetil-espiro[4 4]nonan-2-on (4d) (734 mg, 4,40 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 ml) y se lavó con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recogió y el solvente se removió en vacío El residuo se trituró con acetato de etilo para dar 675 mg (69%) de un sólido blanco después de la recolección y el secado

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J=6 Hz), 1,18 (2H, m), 1,42 (2H, m), 1,72 (1H, m), 2,42 (2H, ABq, J = 16,24 Hz), 2,90 (2H, ABq, J= 12,34 Hz), 12,34 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 186 ($M+1^-$ para la base libre)

EJEMPLO 5 Clorhidrato del acido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético (5)



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso 1 Síntesis del Etil éster del ácido (R)-(3-metil-ciclopentilideno)-acético

NaH (dispersión al 60% en aceite, 1,86 g, 46,5 mmol) se suspendió en tetrahidrofurano seco (40 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (9,69 ml, 48,8 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Luego se agregó(R)-3-metil-ciclopentanona (5a) (5 ml, 46,5 mmol) en THF (10 ml) y la mezcla fue dejada calentar a la temperatura ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase orgánica se separó, se lavó con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió

en vacıo El resıduo se purıfıcó mediante cromatografía rápıda (sílıce, acetato de etılo heptano 1 9) para dar 5,45 g (70%) de (2) como un aceıte ıncoloro

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,04, (3H, m), 1,27 (3H, t, J= 7 Hz), 1,80-2,74 (7H, m), 2,90-3,15 (1H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,76 (1H, s)

MS (CI^+) m/e 169 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1205, 1371, 1653, 1716, 2955

Paso ıı Sıntesıs del Etıl ester del ácido (cıs/trans)-(3R)-(3-metıl-1-cıclopentıl)-acétıco (5c)

Etıl éster de ácıdo (R)-(3-metıl-cıclopentılıdeno)-acétıco (5b) (3,0 g, 17,8 mmol) se dısolvrıó en tetrahıdrofurano (20 ml) y se agıtó a 70°C con nıtrometano (1,92 ml, 35,6 mmol) y fluoruro de tetrabutılamonıo (1,0 M en tetrahıdrofurano, 25 ml, 25,0 mmol) Pasadas 18 horas, la mezcla se enfrıó a la temperatura ambıente, se dıluyó con acetato de etılo (50 ml) y se lavó con HCl 2N (30 ml) y luego con solucıón salına (50 ml) La fase orgánıca se recogıó, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removıó en vacío El resıduo se purıfıcó mediante cromatografía rápıda (sílıce, acetato de etılo heptano 1 9) para dar 2,00 g (49%) de un aceıte claro

553
465

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,02, (3H, d, J= 6 Hz), 1,08-1,37 (5H, m), 1,59-2,17 (5H, m), 2,69 (2H, m), 4,15 (2H, q, J = 7 Hz), 4,64 (2H, s)

MS (ES^+) m/e 230 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1183, 1377, 1548, 1732, 2956

Paso iii Síntesis de la (cis/trans)-(7R)-7-Metil-espiro[4 4]nonan-2-ona (5d)

Etil éster del ácido (cis/trans)-(3R)-(3-metil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (5c) (1,98 g, 8,66 mmol) se disuelve en metanol (50 ml) y se agita sobre catalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrógeno (40 psi) a 30°C Pasadas 18 horas, el catalizador se remueve mediante filtración a través de celita El solvente se remueve en vacío y el residuo se purifica mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 1 1) para dar 1,05 g (79%) de un sólido blanco

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,03, (3H, m), 1,22 (2H, m), 1,60-2,15 (5H, m), 2,22 (2H, m), 3,20 y 3,27 (2H total, 2 x s, cis y trans), 6,18 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 154 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1695, 2949, 3231

194

~~466~~
554

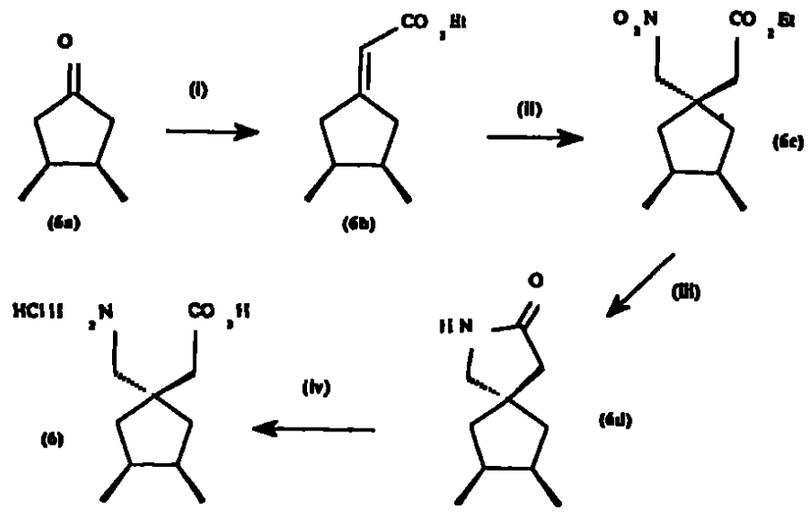
Paso iv Síntesis del Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acetico (5)

La (cis/trans)-(7R)-7-metil-espiro[4 4]nonan-2-ona (5d) (746 mg, 4,88 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfria a la temperatura ambiente, se diluye con agua (20 ml) y se lava con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recoge y el solvente se remueve en vacio El residuo se tritura con acetato de etilo para dar un sólido blanco que se recoge y se seca Esto se cristaliza desde acetato de etilo/metanol para dar 656 mg (65%) de (5) después de la recolección y el secado

^{1}H NMR 400 MHz, (d_6-DMSO) δ 0,96, (3H, m), 1,01-1,24 (2H, m), 1,42-2,10 (5H, m), 2,41 y 2,44 (2H total, 2 x s, cis/trans), 2,94 (2H, m), 7,96 (3H, br s), 12,35 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 172 (M+1 para la base libre)

EJEMPLO 6 Clorhidrato del acido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso i Sintesis del Etil éster del ácido (cis)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (6b)

NaH (dispersión al 60% en aceite, 519 mg, 12,96 mmol) se suspendió en tetrahidrofurano seco (30 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (2,68 ml, 13,5 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Luego se agregó (3S,4R)-3,4-dimetil-ciclopentanona (6a) (1,21 g, 10,80 mmol) en THF (10 ml) y la mezcla se dejó calentar a la temperatura

ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase organica se separó, se lavó con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 5 95) para dar 1,40 g (71%) de (2) como un aceite incoloro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,84, (3H, d, J = 6 Hz), 0,91 (3H, d, J= 6 Hz), 1,26 (3H, t, J = 7 Hz), 2,01-2,95 (6H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,76 (1H, s)

MS (CI^+) m/e 183 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1043, 1125, 1200, 1658, 1715, 2959

Paso ii Síntesis del Etil éster del acido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético

Etil éster del ácido (cis)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (**6b**) (1,384 g, 7,60 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se agitó a 70°C con nitrometano (0,82 ml, 15,2 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en tetrahidrofurano, 11,4 ml, 11,4 mmol) Pasadas 6 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyo con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl a 2N (30 ml) y luego con solucion salina (50 ml) La fase orgánica se recogió, se seco ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografia rápida (sílice,

acetato de etilo heptano 5 95) para dar 0,837 g (45%) de un aceite claro

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J = 6 Hz), 1,21-1,39 (5H, m), 1,98 (2H, m), 2,18 (2H, m), 2,64 (2H s), 4,15 (2H, q, J = 7 Hz), 4,61 (2H, s)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1184, 1377, 1548, 1732, 2961

Paso iii Síntesis de la (trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 4]nonan-2-ona (6d)

Etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (6c) (0,83 g, 3,4 mmol) se disolvió en metanol (30 ml) y se agitó sobre cátalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrógeno (40 psi) a 30°C Pasadas 4 horas, el catalizador se removió mediante filtración a través de celita El solvente se removio en vacío para dar 567 mg (99%) de un aceite de color amarillo palido que solidificó en reposo

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J = 6 Hz), 1,91 (2H, m), 2,10 (2H, m), 2,32 (2H, s), 3,18 (2H, s), 5,61 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 168 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} , 1304, 1450, 1699, 2871, 3186 .

558

Paso iv Síntesis del Clorhidrato del ácido (trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético (6)

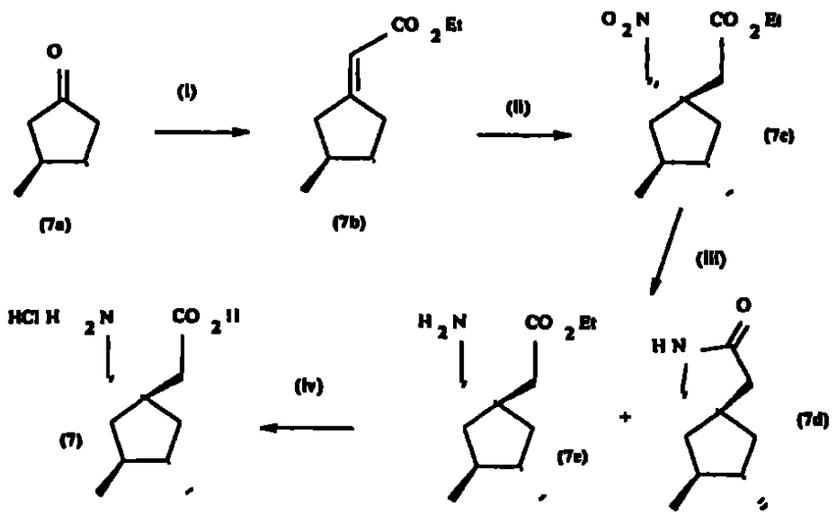
La (trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 4]nonan-2-ona (6d) (563 mg, 4,40 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 ml) y se lavó con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recogió y el solvente se removió en vacio El residuo se trituró con acetato de etilo para dar un sólido blanco que se recogió y se secó Esto se recristalizó desde acetato de etilo/metanol para dar 440 mg (59%) de (6) después de la recolección y el secado

^{1}H NMR 400 MHz, (d_6-DMSO) δ 0,84, (6H, d, J = 6 Hz), 1,21 (2H, m), 1,81 (2H, m), 2,06 (2H, m), 2,47 (2H, s), 2,89 (2H, s), 7,94 (3H, br s), 12,30 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 186 (M+1 para la base libre)

EJEMPLO 7 Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico

559
4H



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

La (3S,4S)-3,4-Dimetil-ciclopentanona (7a) es conocida en la bibliografía y puede ser sintetizada mediante los métodos descriptos en ella Y Kato, *Chem Pharm Bull*, 1966,14 1438-1439 y referencias relacionadas W C M C Kokke, F A Varkevisser, J *Org Chem* , 1974,39 1535, R Baker, D C Billington, Iwanaga,, H Yamamoto, *Tet Lett* , 1986,27 4507, G Solladie, 0 Lohse, *Tet Asymm* , 1993,4 1547, A Rosenquist, I Kvarnstrorn, S C T Svensson, B Classon, B Samuelsson, *Acta Chem Scand* , 1992,46 1127, E J Corey, W Su, *Tet Lett* , 1988,29 3423, D W Knight, B Ojhara, *Tet Lett* , 1981,22 5101

Paso i Síntesis del Etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (7b)

A una suspensión de hidruro de sodio (1,3 g, 32,5 mmol) en THF (60 ml) bajo nitrógeno a 0°C, se agregó trietilfosfonoacetato (6,5 ml, 32,7 mmol) durante 5 minutos Después de agitar durante otros 10 minutos, se agrego una solución de (3S,4S)-3,4-dimetil-ciclopentanona (7a) (aproximadamente 2,68 g, 30 mmol) en THF) (2 x 10 ml), a la solución que ahora es clara y se removió el baño de hielo Pasadas 4 hora, se extinguió la reacción vertiendo en agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con éter (400 ml) La fase orgánica se enfrió con solución salina saturada (100 ml), se secó y se concentró en vacío La cromatografía de columna (10 1 heptano/acetato de etilo) dio el producto como un aceite (4,53 g) (aproximadamente 91% de rendimiento)

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1,01 (3H, d, J = 6 Hz), 1,03 (3H, d, J = 6 Hz), 1,26 (3H, t, J = 7 Hz), 1,49 (2H, m), 2,07 (1H, m), 2,24 (1 H, m), 2,61 (1H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,72 (1H, s)

MS (CI^+) m/c 183 (M+1)

Paso ii Etil éster del acido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (7c)

198

473-501

A una solución del etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (7b) (4,24 g 23,3 mmol) en THF (15 ml), se agregó TBAF (32 ml, de una solución a 1 M en THF, 32 mmol) y luego nitrometano (3 ml) y la reacción se calentó a 60°C durante 8 horas Después de enfriar, la mezcla de la reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con HCl 2N (40 ml) y luego con solución salina saturada (50 ml) La cromatografía de columna (10 1 heptano/acetato de etilo) dio el producto como un aceite (2,24 g) (40% de rendimiento)

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J = 6 Hz), 1,10-1,39 (5H, m), 1,47 (2H, m), 1,87 (1H, s), 2,03 (1H, s), 2,57 (2H, ABq, J= 16,38 Hz), 4,14 (2H, q, J= 7 Hz), 4,61 (2H, ABq, J= 12,60 Hz)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} , 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Paso iii Síntesis del Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico (7)

Una solución de etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (7c) (3,5 g, 14,4 mmol) en metanol (100 ml) en la presencia de una esponja de Ni se hidrogenó a 30°C y a 50 psi durante 4 horas El filtrado del catalizador y la concentración en vacío dio una mezcla de 2 1 de lactama y aminoester, 2,53 g, calculado como 96%, que se

562 1999
474

usó sin purificacion Esta mezcla (2,53 g, 13,8 mmol) en dioxano (15 ml) y HCl a 6N (45 ml) se calentó bajo reflujo (baño de aceite = 110°C) durante 24horas Después de enfriar y diluir con agua (60 ml), la mezcla se lavó con diclorometano (3 x 50 ml) y luego se concentró en vacío El aceite resultante se lavó con acetato de etilo y luego con diclorometano para dar una espuma pegajosa que se secó para dar el producto como un polvo blanco (2,32 g) (Rendimiento del 76%)

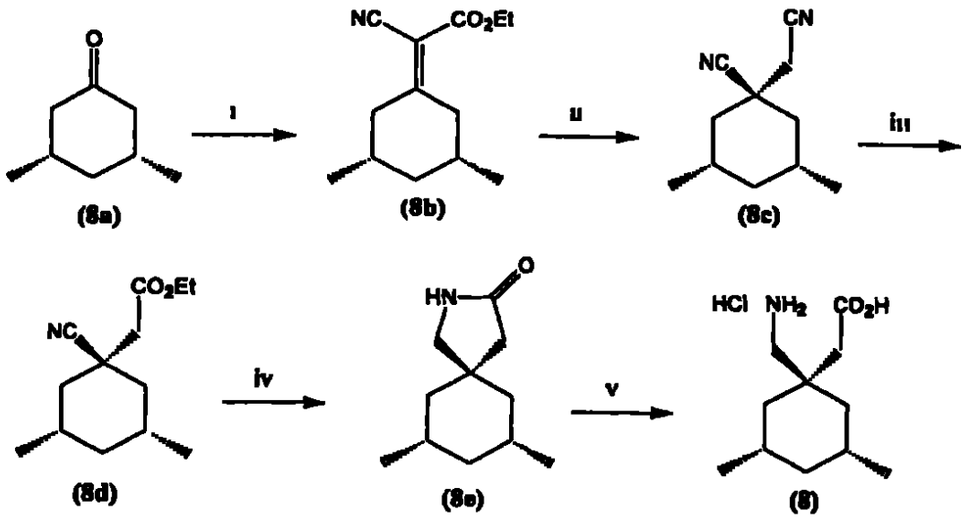
α_D(23°C)(H_2O)(c=1,002)=+28,2°

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0,91 (6H, d, J = 6 Hz), 1,18 (2H, m), 1,42 (2H, m), 1,72 (1H, m), 1,87 (1H, m), 2,42 (2H, ABq, J = 16, 24 Hz), 2,90 (2H, ABq, J = 12, 34 Hz), 8,00 (3H, br s), 12,34 (1H, br s)

MS (ES^+) m/c 186 (M+1 para la base libre)

563

EJEMPLO 8 Clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico



Paso 1 Sintesis del Etil éster-del ácido 2-ciano-((3R,5S)-3,5-dimetil-ciclohexilideno)-acetico (8b) Cis-3,5-dimetilciclohexanona (8a, 15,78 g, 125,0 mmol) se disolvió en tolueno (150 ml) y se trató con acetato de amonio (0,96 g, 0,099 mmol), ácido acético (1,4 ml, 0,195 mmol) y etil cianoacetato (14,04 g, 99,2 mmol) La reacción se calentó a reflujo toda la noche con una trampa de Dean-Stark, luego se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con H_2O (3 x 50 ml) La capa acuosa se lavó nuevamente con tolueno (2 x 50 ml) Las capas orgánicas, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de silice

564
476

eluyendo con 5% de EtOAc/hexano para dar 22,0 g (80%) del producto deseado como un aceite claro

MS 222,1 (M+1 para $C_{13}H_{19}N_1O_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,40 (9 1 hexano/EtOAc), Análisis ($C_{13}H_{19}N_1O_2$) (Cal) C 70,56, H 8,68, N 6,33 (hallado) C 70,74, H 8,68, N 6,33 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,83-0,95 (m, 1 H), 1,01 (t, 6 H, J = 6,1 Hz), 1,32 (t, 3 H, J = 7,3 Hz), 1,48-1,85 (m, 5 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 3,92 (dd, 1 H, J = 12,2, 2,2 Hz), 4,24 (q, 2 H, J = 7,1 Hz)

Paso ii Síntesis del 1α,3β,5β-1-Cianometil-3,5-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (8c)

El etil éster del ácido 2-ciano-((3R,5S)-3,5-dimetil-ciclohexilideno)-acético (8b, 6,64 g, 30,0 mmol) se disolvió en EtOH (60 ml) y se agregó a una suspensión de NaCN (1,47 g, 30,0 mmol) en EtOH / H_2O (100 ml / 8 ml) La reacción se calentó a reflujo toda la noche, luego se enfrió a la temperatura ambiente, se filtró y se concentró en vacío para dar un aceite claro que se solificó bajo vacío El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 4 1 hexano/EtOAc para dar 4,05 g (77%) del producto deseado como un sólido pegajoso, blanco

MS no se observó ningun ion de M+1 ($C_{11}H_{16}N_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,31 (4 1 hexano/EtOAc), Análisis ($C_{11}H_{16}N_2$) (Cal) C 74,96, H 9,15, N 15,89 (hallado) C 74,81, H 9,25, N 15,65 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,58 (dd, 1H, J= 24,9, 12,2 Hz), 0,96 (d, 6 H, J = 6,6 Hz), 1,03 (t, 2H, J = 12,9 Hz), 1,75-1,90 (m, 3H), 2,01 (d, 2H, J= 11,5 Hz), 2,65 (s, 2H)

Paso iii Síntesis del Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8d) 1α,3β,5β-1-Cianometil-3,5-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (8c, 5,51 g, 31,26 mmol) se disolvió en EtOH (80 ml) y tolueno (80 ml), se enfrió a 0°C y se saturó con gas de HCl La solución fue detenida y agitada toda la noche a temperatura ambiente, luego conentrada en vacío para dar el imino éster crudo como un sólido blanco Este material crudo se trituró con Et_2O (150 ml) y se secó bajo vacío, a temperatura ambiente, luego se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml) Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 6 1 hexano/EtOAc para dar 5,78 g (83%) del producto deseado como un aceite claro

MS 224,1 (M+1 para $C_{13}H_{21}N_1O_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,32 (6 1 hexano/EtOAc), Analisis ($C_{13}H_{21}N_1O_2$) (Cal) C 69,92, H 9,48, N 6,27 (hallado) C 70,03, H 9,45, N 6,30 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,9, 12,0 Hz), 0,91 (d, 6 H, J = 6,6 Hz), 1,27 (1, 3 H, J = 7,1 Hz), 1,70-1,76 (m, 1 H), 1,80-1,90 (m, 2 H), 2,02 (d, 2 H, J = 12,9 Hz), 2,51 (s, 2 H), 4,18 (q, 2 H, J = 7,1 Hz)

Paso iv Síntesis de la 5α,7β,9β-7,9-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (8e)

Etil éster del ácido 1α,3β,5β-(1-ciano-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8d, 5,82 g, 26,1 mmol) se disolvio en MeOH (150 ml), se trató con 10% Rh/2% Pd/C (1,0 g) y se agitó bajo una atmosfera de H_2 (50 psi) durante 28 h La reacción se filtró y se concentró en vacio El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de silice con un gradiente de 2 3 hexano/EtOAc, EtOAc, 5% MeOH/EtOAc para dar 2,21 g (47%) del producto deseado

MS 182,0 (M+1 para $C_{11}H_{19}N_1O_1$), punto de fusión 116°C-118°C, TLC SiO_2, R_f 0,36 (6% MeOH/CH_2Cl_2), Analisis ($C_{11}H_{19}N_1O_1$) (Cal) C 72,88, H 10,56, N 7,73 (hallado) C 72,84, H 10,67, N 7,63 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,49 (dd, 1H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,86-0,93 (m, 8 H), 1,38-1,48 (m, 2 H), 1,60-1,71 (m, '3 H), 2,09 (s, 2 H), 3,16 (s, 2 H), 5,79 (br, 1 H)

SGT
479

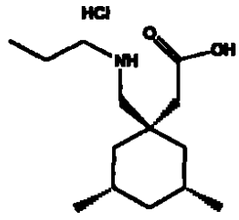
Paso v Síntesis de la sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico (8) La 5α,7β,9β-7,9-dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (8e, 0,52 g, 2,87 mmol) se trató con HCl a 6N (19 ml) y se calentó a reflujo toda la noche La reacción se enfrió a temperatura ambiente, con lo cual se formó un precipitado blanco El sólido se filtró, y el filtrado se enfrió a 0°C para lograr una segunda cosecha de cristales, luego se filtró nuevamente Los sólidos se combinaron y se secaron bajo vacio para dar 0,46 g (68%) del producto deseado

MS 200,1 (M+1 para $C_{11}H_{21}N_1O_2$), punto de fusión 179°C-180°C, Análisis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 56,04, H 9,41, N 5,94 (hallado) C 56,16, H 9,42, N 5,73 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,46-0,53 (m, 1 H), 0,77 (t, 1 H, J = 12,5 Hz), 0,85-0,91 (m, 7 H), 1,55-1,67 (m, 5 H), 2,11 (d, 2 H, J = 13,4 Hz), 2,36 (s, 2 H), 2,44 (s, 1 H), 3,14 (s, 2 H)

568

480

EJEMPLO 9 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acetico

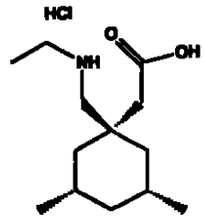


Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8, 1,0g, 4,2 mmol) se disolvió en EtOH (100 ml), se trató con una solución de hidróxido de sodio (1N, 5 ml), propionaldehido (0,9 ml, 12,6 mmol) y 10% de Pd/C (0,3g) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 3 h La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O (1 M, 10 ml) y se concentró en vacío El residuo se trató con isopropanol caliente (100 ml), el NaCl se filtró, y la solución clara se concentró en vacío El product rudo se recristalizó desde i-PrOH/acetona/hexano (14 200 225 ml) y se secó bajo vacío para dar 0,136 g (12%) del producto deseado

MS 242,1 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 178°C-180°C, Análisis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$ HCl 0,27H_2O) (Cal) C 59,48, H 10,18, N 4,95 (hallado) C 59,53, H 10,21, N 4,78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,52 (dd, 1 H, J = 24,2, 12,0 Hz), 0,83-0,90 (m, 8 H), 1,00 (t, 3 H, J = 7,6 Hz), 1,61-1,80 (m, 7 H), 2,43 (s, 2 H), 2,98 (t, 2 H, J = 7,8 Hz), 3,20 (s, 2 H)

569
481

EJEMPLO 10 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético

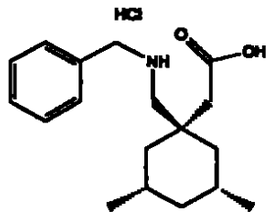


El Ejemplo 10 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó acetaldehído en lugar de propionaldehído y se usó acetetato de etilo/heptano para la recristalización (rendimiento 30%)

MS (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 188°C-190°C, ^1H NMR (DMSO) δ 0,83 (8H, br d), 1,24 (3 H, t, J = 7,1 Hz), 1,60 (6 H, m), 2,38 (d, s), 2,98 (2 H, m), 3,10 (2 H, br s), 8,33 (2 H, br s), 12,42 (1 H, br s)

570
482

EJEMPLO 11 Sal de Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil-acetico

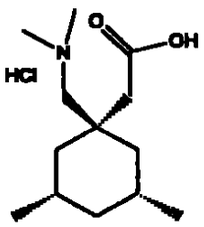


El Ejemplo 11 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó benzaldehído en lugar de propionaldehído y que se usó Et_2O para la recristalización (rendimiento 30%)

MS 290,1 (M+1 para $C_{18}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 162°C-163°C, Análisis ($C_{18}H_{27}N_1O_2$ HCl 0,2$OH_2$0) (Cal) C 65,62, H 8,69, N 4,25 (hallado) C 65,60, H 8,71, N 4,31 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,48 (dd, 1 H, J = 12,5 Hz), 0,79-0,90 (m, 8 H), 1,46 (br, 2 H), 1,64 (d, 3 H, J = 13,4 Hz), 2,42 (s, 2 H), 3,19 (s, 2 H), 4,23 (s, 2 H), 7,43-7,50 (m, 5 H)

571
483

EJEMPLO 12 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético

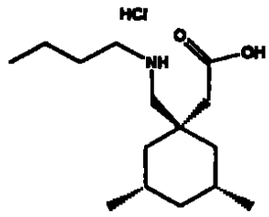


Una solución de la sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8, 0,20 g, 0,59 mmol) en EtOH (15 ml), solución de hidróxido de sodio (1 N, 0,59 mmol) y H_2O (1 ml) se trató con 20% de Pd/C (50 mg) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 15 horas) La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O a 1 N (1 ml) y se concentró en vacío El residuo se disolvió en i-PrOH caliente (4 ml), se diluyó con acetona (100 ml) y Et_2O (350 ml) y se enfrió a 0°C El sólido se filtró y se secó bajo vacío para dar 103 mg (rendimiento del 70%) del producto deseado

MS 228,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusion 195°C-196°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl 0,41H_2O) (Cal) C 57,58, H 9,97, N 5,16 (hallado) C 57,73, H 9,71, N 4,91 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,56 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,89-0,92 (m, 8 H), 1,59-1,75 (m, 8 H), 2,51 (s, 2 H), 2,95 (s, 6 H), 3,44 (s, 2 H)

572
484

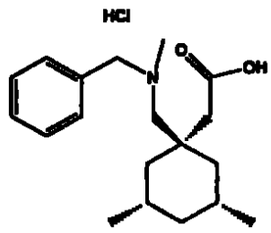
EJEMPLO 13 Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético



El ejemplo 13 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó butiraldehído en lugar de propionaldehido (rendimiento del 48%)

MS 256,1 (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 184°C-185°C, Análisis ($C_{15}H_{29}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 61,73, H 10,36, N 4,80 (hallado) C 61,71, H 10,21, N 4,72 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,86-0,99 (m, 11 H), 1,37-1,47 (m, 2 H), 1,60-1,75 (m, 7 H), 2,43 (s, 2 H), 3,02 (t, 2 H, J = 8,1 Hz), 3,20 (s, 2 H)

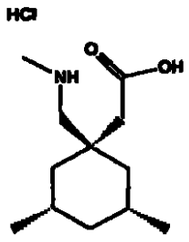
EJEMPLO 14 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético



573
485

El Ejemplo 14 se preparó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usaron el análogo de N-bencilo (11) y formaldehído como los materiales iniciales y que se usó PtO_2 como el catalizador en lugar de Pd/C (rendimiento del 70%) MS 304,1 (M+1 para $C_{19}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 209°C-210°C, Análisis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$ HCl 0,21$H_2$0) (Cal) C 66,40, H 8,92, N 4,08 (hallado) C 66,40, H 9,05, N 4,06 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,51 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,2 Hz), 0,79-0,92 (m, 9 H), 1,29 (br, 1 H), 1,56-1,82 (m, 4 H), 2,51 (dd, 2 H, J = 18,8, 16,3 Hz) 2,85 (s, 2 H), 3,23-3,49 (m, 2 H), 4,37 (dd, 2 H, J = 31,7, 12,7 Hz), 7,45-7,54 (m, 5 H)

EJEMPLO 15 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acetico

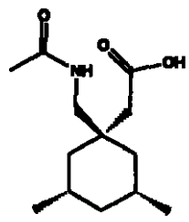


El Ejemplo 14 (0,14 g, 1,21 mmol) se disolvió en 95% de EtOH (50 ml), se trató con solución de hidróxido de sodio (1 N, 1,21 mmol) así como 20% de Pd/C (0,1 g), y se agito bajo una

574
486

atmósfera de H_2 (50 psi) durante 45 minutos La reacion se filtró, se trato con HCl/Et_2O (1 M, 1 ml), y se concentró en vacio El residuo se trató con iPr/OH caliente, el NaCl se filtró y la solución se concentró en vacío El producto crudo se recristalizó desde iPrOH/acetona/hexano (7 150 110 ml) y se secó bajo vacío para dar 0,189 (63%) del producto deseado
MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 182°C-183°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl H_2O) (Cal) C 57,70, H 9,68, N 5,61 (hallado) C 57,47, H 9,58, N 5,35 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,52 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,2 Hz), 0,84-0,98 (m, 8 H), 1,57-1,72 (m, 5 H), 2,38 (s, 2 H), 2,72 (s, 3 H), 3,21 (s, 2 H)

EJEMPLO 16 Acido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico

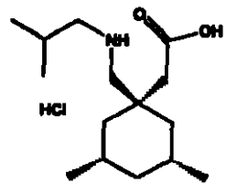


El Ejemplo 8 (0,5 g, 21, mmol) se trató con H_2O (10 ml) y NaOH (0,56 g, 14,0 mmol), se enfrió a 0°C y se trató con anhidrido acético La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con HCl

1N (100 ml) La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró en vacío El material crudo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 4% de $MeOH/CH_2Cl_2$ para dar 0,138 g (27%) del producto deseado como un aceite que se solidificó bajo vacío

MS 242,1 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_3$), punto de fusión 122°C-124°C, Análisis ($C_{13}H_{23}N_1O_3$) (Cal) C 64,70, H 9,61, N 5,80 (hallado) C 64,65, H 9,59, N 5,63 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,46 (dd, 1 H, J = 23,7, 11,7 Hz), 0,81-0,87 (m, 9 H), 1,56 (d, 2 H, J = 13,4 Hz), 1,65-1,76 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 2,18 (s, 2 H), 3,30 (s, 3 H)

EJEMPLO 17 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético



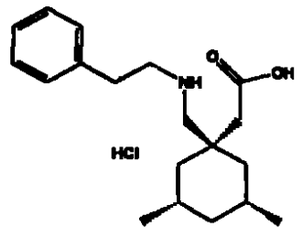
El Ejemplo 17 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó isobutiraldehido en lugar de propionaldehído (rendimiento del 53%)

MS 256 (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 193°C-194°C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1H, J = 24,3, 12,5 Hz), 0,81-0,90 (m, 2

576
488

H), 0,89 (d, 6H, J = 6,4 Hz), 1,03 (d, 6H, J = 6,8 Hz), 1,57-1,71 (m, 5H), 2,09 (m, 1 H), 2,49 (s, 2 H), 2,88 (d, 2H, J = 7,1 Hz), 3,19 (s, 2 H)

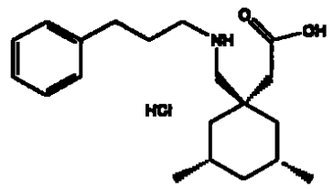
EJEMPLO 18 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético



El Ejemplo 18 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó fenilacetaldehído en lugar de propionaldehído (rendimiento del 16%)

MS 304 (M+1 para $C_{19}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 188°C-189°C, Análisis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 67,14, H 8,90, N 4,12 (hallado) C 66,94, H 8,91, N 3,98 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,46 (dd, 1 H, J = 24,6, 12,3 Hz), 0,81-0,91 (m, 8 H), 1,58-1,72 (m, 5 H), 2,50 (s, 2H), 3,04-3,08 (m, 2H), 3,26-3,30 (m, 4H), 7,23-7,75 (m, 5H)

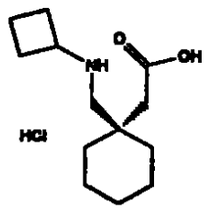
EJEMPLO 19 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético



El ejemplo 19 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó hidrocinamaldehido en lugar de propionaldehído (rendimiento del 50%)

MS 318 (M+1 para $C_{20}H_{31}N_1O_2$), punto de fusión 171°C-172°C, Análisis ($C_{20}H_{31}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 67,87, H 9,11, N 3,96 (hallado) C 67,83, H 9,13, N 3,78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,6, 12,1 Hz), 0,80-0,90 (m, 2 H), 0,90 (d, 6H, J = 6,0 Hz), 1,60-1,72 (m, 5 H), 2,03-2,11 (m, 2H), 2,45 (s, 2H), 2,73 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,06 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 3,3 (s, 2H), 7,20-7,18 (m, 5H)

EJEMPLO 20 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético

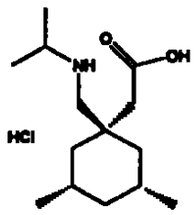


578
490

El Ejemplo 20 se sintetizó de acuerdo con el Ejemplo 26, salvo porque se usó ciclobutano en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 70%)

MS 226 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 176°C-177°C, Análisis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,64, H 9,24, N 5,35 (hallado) C 59,88, H 9,18, N 5,19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,16-1,60 (br, 10 H), 1,80-1,96 (m, 2 H), 2,21-2,40 (m, 4 H), 2,53 (s, 2H), 2,97 (s, 2H), 3,73 (M, 1 H)

EJEMPLO 21 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[1-(isopropilamino-metil)-3-dimetil-ciclohexil]-acético



El Ejemplo 21 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó acetona en lugar de propionaldehído (rendimiento del 50%)

MS 242 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 206°C-207°C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,8, 12,5 Hz), 0,80-0,90 (m, 2 H), 0,99 (d, 6H, J = 6,1 Hz), 1,35 (d, 6H, J = 6,6 Hz), 1,55-1,78 (m, 5H), 2,45 (s, 2H), 3,18 (s, 2 H), 3,41 (m, 1H)

579
491

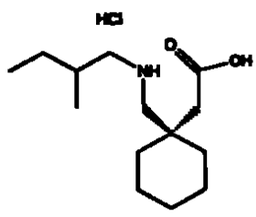
EJEMPLO 22 El ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 23 El ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acetico se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 24 La sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 25 La sal de sodio del ácido 1-(1-hidroximetil)ciclohexano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 2 960 441, 1960

EJEMPLO 26 Síntesis de la sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético



580
492

Una solución del ácido (1-aminometil-ciclohexil)-acético (Ejemplo 22, 2,0 g, 11,7 mmol) en EtOH (100 ml) se trató con 2-metil-butiraldehído (4 ml, 35,1 mmol) y PtO_2 (0,5 g) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 2 h La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O a 1 N (12 ml), se concentró en vacío, se disolvió en i-PrOH caliente (10 ml), se diluyó con acetona (600 ml), se enfrió a 0°C y se filtró para dar 1,58 g (49%) del producto deseado

MS 242,1 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 162°C-163°C, Análisis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 60,52, H 10,16, N 5,04 (hallado) C 60,41, H 10,26, N 4,95 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,95 (t, 3 H, J = 7,3 Hz), 1,02 (d, 3 H, J = 6,6 Hz), 1,20-1,31 (m, 1 H), 1,42-1,56 (m, 11 H), 1,81-1,89 (m, 1 H), 2,63 (dd, 2 H, J = 18,3, 16,1 Hz), 2,82 (dd, 1 H, J = 12,5, 8,3 Hz), 2,99 (12,5, 6,1 Hz), 3,07 (dd, 2 H, J = 25,6, 12,9 Hz)

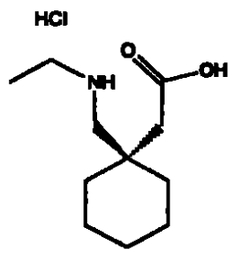
EJEMPLO 27 La sal de clorhidrato del acido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó 4-trifluorobutiraldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 19%)

MS 282,1 (M+1 para $C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$), punto de fusión 163°C-164°C, Análisis ($C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$ HCl $O,O5H_2O$) (Cal) C 49,00, H 7,31, N 4,40 (hallado) C 48,60, H 7,29, N 4,19 ^1H NMR (CD_3OD) δ

581
493

1,40-1 ,4 (m, 11 H), 1,96-2,04 (m, 2 H), 2,26-2,38 (m, 2 H), 2,57 (s, 2H), 3,09-3,13 (m, 4 H)

EJEMPLO 28 Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético

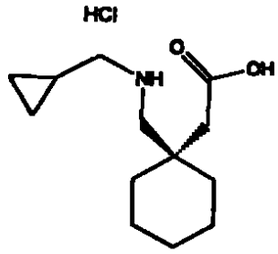


El Ejemplo 28 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó acetaldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 30%)

MS 200,1 (M+1 para $C_{11}H_{21}N_1O_2$), punto de fusión 160°C-166°C, Análisis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 56,04, H 9,41, N 5,94 (hallado) C 55,98, H 9,36, N 5,79 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,31-1,54 (m, 13 H), 2,54-2,56 (m, 2 H), 3,06-3,13 (m, 4 H)

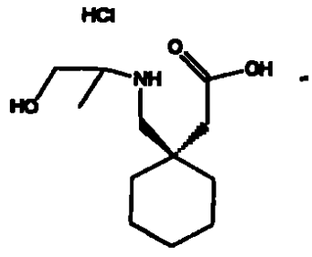
EJEMPLO 29 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(Ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético

582
494



El Ejemplo 29 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo porque se usó ciclopropanocarboxaldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 62%)
MS 226 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 177°C-178°C, Analisis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,64, H 9,24, N 5,35 (hallado) C 59,72, H 9,15, N 5,27 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,50-0,56 (m, 2 H), 0 71-0 74 (m, 2H), 1 05-1 30 (m, 1 U), 1 42-1 54 (m, 1OH), 2,52 (s, 2H), 2,94 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 3,10 (s, 2H)

EJEMPLO 30 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico

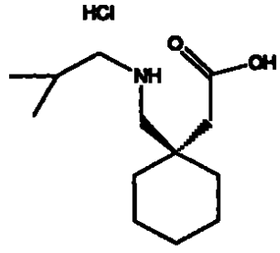


583
495

El Ejemplo 30 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó 1-hidroxi-2-propano en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 60%)

MS 230 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_3$), punto de fusión 164°C-165°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_3$ HCl) (Cal) C 54,23, H 9,10, N 5,27 (hallado) C 54,23, H 9,01, N 5,18 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,30-1,32 (m, 3 H), 1,44-1,55 (m, 1OH), 2,60 (s, 2H), 3,11 (m, 2H), 3,28 (br, 2H), 3,37 (hr, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,78-3,81 (m, 1H)

EJEMPLO 31 Sal de clorhidrato del acido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético



El Ejemplo 31 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó ciclopropanocarboxaldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 35%)

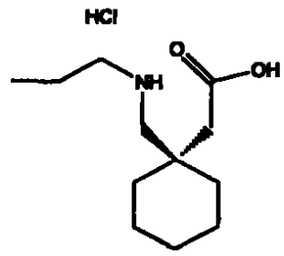
1

MS 228 (M+1 para $C_{13}H_{25}N_1O_2$), punto de fusión 175°C-176°C, Análisis ($C_{13}H_{25}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,19, H 9,93, N 5,51, (hallado) C 59,28, H 9,98, N 5,24 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,03 (d,

584
496

6H, J = 6,9 Hz), 1,37-1,60 (m, 10H), 2,10-2,17 (m, 1H), 2,63 (s, 2H), 2,87 (d, 2H, J = 7,4 Hz), 3,07 (s, 2H)

EJEMPLO 32 Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acetico

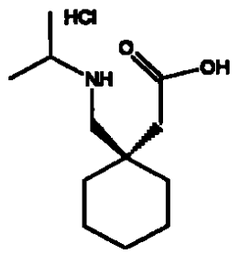


El Ejemplo 32 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó propionaldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído

MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 174°C-177°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 57,70, H 9,69, N 5,61 (hallado) C 57,55, H 9,77, N 5,48 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,93 (t, 1 H, J = 6,3 Hz), 0,99-1,03 (m, 4 H), 1,40-1,54 (m, 13 H), 1,72-1,78 (m, 2 H), 2,96-3,29 (m, 2 H)

EJEMPLO 33 Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acetico

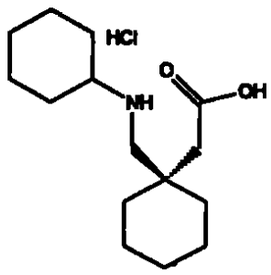
585
497



El Ejemplo 33 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo porque se usó acetona en lugar de 2-metilbutiraldehído

MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 193°C-194°C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 1,29-1,57 (m, 18 H), 2,59 (s, 2 H), 3,07 (s, 2 H), 3,38-3,42 (m, 1H)

EJEMPLO 34 Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético

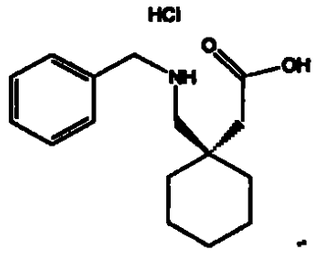


El Ejemplo 34 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó ciclohexanona en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 48%)

586
498

MS 254 (M+1 para $C_{15}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 198°C-199°C, Análisis ($C_{18}H_{27}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 62,12, H 9,74, N 4,83 (hallado) C 62,18, H 9,84, N 4,75 ^1H NMR (CD30D) 8 1,20-1,60 (m, 16 H), 1,63-1,76 (m, 1H), 1,88 (br, 2H), 2,13 (br, 2H), 2,60 (m, 2H), 3,09 (m, 3H)

EJEMPLO 35 Sal de clorhidrato del acido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil)-acético



El Ejemplo 35 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó benzaldehido en lugar de 2-metilbutiraldehído

MS 262,0 (M+1 para $C_{19}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 125°C-135°C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 1,38-1,49 (m, 11 H), 2,55 (s, 2 H), 3,07 (s, 2 H), 4,23 (s, 2 H), 7,43-7,49 (m, 5 H)

587
499

EJEMPLO 36 Resumen

Usando un modelo fuera del cuerpo vivo de retinas de ratas recién disecadas, se investigaron los mecanismos por los cuales los niveles de glutamato en el cerebro son mantenidos dentro de los límites normales La síntesis de glutamato anaplerótico puede ser importante para reabastecer de glutamato oxidado en la glia después de una neurotransmisión Los puntos de control de velocidad a través de esta vía de renovación se identificaron como carboxilación de piruvato y transaminación de cadena de amino ramificada Para ensayar la relación entre la sintesis del glutamato y la actividad de la carboxilasa de piruvato, la síntesis del ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ se midió en función del piruvato del medio El incremento del piruvato de 0,2 mM a 5 mM incremento la síntesis de los ^{14}C-aminoácidos en un 66% ± 15% La radioactividad específica de la glutamina en relación con la de $H^{14}CO_3$ pasados 20 minutos de incubación indicó que un ≈30% de glutamina en la retina deriva de la fijación de bicarbonato Para ensayar la dependencia de la síntesis del glutamato con respecto a los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) como una fuente de nitrógeno, se midió el efecto de la inhibición de la aminotransferasa de cadena ramificada neuronal (BCATc) La gabapentina (GBP) (1 mM), un inhibidor selectivo de la

588
B00

BCATc en las meuronas, inhibió la síntesis del ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ en un 31% sin hacer más lenta la incorporación de $H^{14}CO_3$ en los intermedios de ciclo de lactato y ácido cítrico La inhibición de la nueva síntesis del glutamato fue invertida por el agregado de BCAA a 0,6 mM Los datos indicaron que la carboxilasa de piruvato y la aminotransferasa de cadena ramificada comparten el control de la velocidad de la nueva síntesis del glutamato en la retina, y que la nueva síntesis del glutamato es cuantitativamente importante para mantener los niveles de glutamato retinal

Métodos

Animales experimentales

Se usaron ratas Sprague Dawley (200 g - 400 g) para todos los experimentos Las ratas fueron alojadas en un ciclo de luz y sombra de 12 horas, y provistas de alimento y agua sin límite Después de anestesiar las ratas con nembutal (intraperitoneal), se les extirparon los ojos y se disecaron las retinas en un tampón helado

Fijación del CO_2

Las medias retinas recién aisladas se preincubaron a 37°C durante 3 minutos en el tampón A (pH 7,4) que contenia NaCl a

589
507

118 mM, KCl a 4,7 mM, CaCl a 2,5 mM, KH_2PO_4 a 1,2 mM, $MgSO_4$ a 1,17 mM, HEPES a 20 mM, glucosa a 5 mM, NH_4Cl a 0,05 mM y $NaH^{14}CO_3$ a 25 mM También se incluyó piruvato (a 0,2 mM o 5 mM) en el tampon 1 ml del tampón al igual que la fase de gas dentro de los tubos de 20 ml se equilibraron con 95% de O_2, 5% de CO_2 Las incubaciones se iniciarion con el agregado de 10 µCi/ml de $H^{14}CO_3$ Los recipientes fueron cerrados inmediatamente a la atmósfera La mayor parte de la incubación continuó durante 20 minutos, aunque en algunos estudios preliminares, se variaron los tiempos de 10 a 60 minutos Las reaciones fueron detenidas removiendo las medias retinas del tampón y colocándolas en 2% de ácido perclórico El tampón se acidificó por separado con ácido perclórico (concentración final del 2%) y se dejó que el $^{14}CO_3$ sin reacionar se difundiera fuera de las muestras acidificadas

La cantidad total del producto (metabolitos de carbono 14 no volátiles) se determinó midiendo la radioactividad en alicuotas del medio y muestras de tejido Los metabolitos en los extractos fueron separados mediante cromatografía de acetato de .Dowex-1 como se describió previamente Williamson, J R , y Corkey, B (1969) "Métodos en Enzimología", Volumen 13, ed Lowenstein, J M (*Academic Press*) páginas 434-513, y fueron cuantificados mediante el recuento por centelleo En la mayor parte de los casos, los datos de carbono 14 de cada

590
502

metabolito se informan como la suma de la radioactividad en el medio más los extractos de tejidos La cuantificación completa de las cantidades de ^{14}C-metabolitos en la retina y en el medio pueden hallarse en las Tablas I y II

Los datos que no se muestran en los resultados y en las secciones de discusión se recogieron en el transcurso de la realizacion de la evaluación de la influencia del piruvato sobre la fijación del $H^{14}CO_3$ en la retina La Figura 2 muestra solamente el efecto del piruvato sobre la suma del glutamato mas la glutamina y sobre la suma del piruvato más el lactato La Tabla I proporciona los valores para todos los metabolitos que se etiquetaron con $H^{14}CO_3$ y su compartimentación

De igual manera, los datos adicionales, que no se muestran en los resultados y las secciones de discusión, se recogieron durante la evaluación de la influencia de la gabapentina Por lo tanto, la Tabla II es una expansión de los datos mostrados en la Figura 4, y proporciona valores para todos los metabolitos etiquetados con $H^{14}CO_3$ y su compartimentación

591
503

Tabla I

Condición	Compar-timiento	Gln	Glu	Asp	Lact	Ciclo de TCA	Total
Control (0,2 Pyr)	interno	0,59 ±0,05	1,47 ±0,29	0,85 ±0,06	0,16 ±0,06	1,02 ±0,26	4,08 ±0,41
	externo	0,61 ±0,08	0,04 ±0,01	0,08 ±0,01	0,55 ±0,03	0	1,19 ±0,13
	suma	1,20 ±0,09	1,51 ±0,29	0,93 ±0,08	0,71 ±0,06	1,02 ±0,26	5,27 ±0,45
+5,0 Pyr	interno	0,91 ±0,13	0,91 ±0,29	1,08 ±0,12	0,29 ±0,04	2,31 ±0,13	7,26 ±0,61
	externo	0,96 ±0,14	0,06 ±0,01	0,08 ±0,01	1,18 ±0,11	0	2,24 ±0,21
	suma	1,87 ±0,23	2,73 ±0,28	1,16 ±0,12	1,47 ±0,13	2,31 ±0,13	9,50 ±0,74

Tabla II

Condición	Compar-timiento	Gln	Glu	Asp	Lact	Ciclo de TCA	Total
Control	interno	0,440 ±0,032	1,477 ±0,097	0,634 ±0,038	0,080 ±0,08	1,096 ±0,105	3,715 ±0,266
	externo	0,551	0,08	0,070	0,478	0	1,117

592
504

		±0,036	±0,001	±0,003	±0,030		±0,075
	suma	0,991 ±0,054	1,485 ±0,096	0,704 ±0,040	0,558 ±0,031	1,096 ±0,105	4,832 ±0,303
+GBP	interno	0,389 ±0,026	1,324 ±0,025	0,549 ±0,019	0,089 ±0,006	1,514 ±0,103	3,902 ±0,122
	externo	0,545 ±0,024	0,008 ±0,003	0,035 ±0,003	0,516 ±0,030	0	1,066 ±0,028
	suma	0,934 ±0,036	1,332 ±0,025	0,584 ±0,022	0,605 ±0,028	1,514 ±0,103	4,968 ±0,028
+GBP +BCAA	interno	0,480 ±0,011	1,549 ±0,070	0,609 ±0,021	0,086 ±0,008	1,220 ±0,116	3,989 ±0,043
	externo	0,806 ±0,086	0,009 ±0,001	0,093 ±0,008	0,458 ±0,048	0	1,322 ±0,076
	suma	1,286 ±0,082	1,558 ±0,070	0,702 ±0,016	0,5445 ±0,040	1,220 ±0,116	5,311 ±0,119

El procedimiento cromatográfico empleado en este ejemplo separa la glutamina, el glutamato, el aspartato y el ácido láctico Los intermedios del ciclo del ácido cítrico permanecen en las columnas de Dowex y se estiman como la diferencia entre los recuentos totales en la muestra y los recuentos que son eluidos La prueba de la validez de este procedimiento se han informado previamente Antes de someter las muestras a la cromatografia, el ^{14}C-ácido piruvico en las

593
305

muestras fue convertido en forma estequiométrica en lactato tratando las muestras con exceso de NADH y deshidrogenasa de lactato En consecuencia, se informa que el unico pico de lactato contiene todos los carbonos 14 en el lactato y el piruvato Para determinar la actividad especifica del glutamato y la glutamina en las muestras retinales, se midió fluorometricamente la cantidad de masa del glutamato usando un procedimiento enzimático Patel, M S (1989) en Neurométodos Metabolismo de los Carbohidratos y la Energía, Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (*The Humana Press, Inc*) páginas 309-340 La cantidad de masa de la glutamina se midió después de la separación cromatográfica del glutamato seguida por la determinación luminométrica descripta anteriormente ATP y el fosfato de creatina se midieron fluorométricamente usando un ensayo de enzimas

La proteina retinal se determino usando el ensayo de proteína DC (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) Cada media retina contenia 0,4 mg de proteína

Ensayo de la Carboxilasa de Piruvato

La actividad de la carboxilasa de piruvato se ensayó en muestras nuevas de cerebro completo y de retinas extirpadas Se usó el método descripto por Patel, M S (1989) en

594
5706

Neurométodos Metabolismo de los Carbohidratos y de la Energia, Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (The Humana Press), páginas 309-340, que consiste en medir la fijación del $^{14}CO_3$ en condiciones óptimas en tejido

Inmunotransferencia

Se realizó SDS-PAGE como lo describió en Patel, M S (1989) en *Neurometodos Metabolismo de los Carbohidratos y de la Energía,* Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (The Humana Press, Inc), página 309-340, usando 10% de gel Para la inmunotransferencia, se transfirieron proteínas a las membranas de Immobilon P Las membranas fueron bloqueadas con 5% de BSA e incubadas con el anticuerpo de péptido de BCATc antiratas de conejo purificado por inmunoafinidad (1 1 00 de dilución) o el anticuerpo de péptido de BCATm antihumano de conejo purificado por inmunoafinidad (1 1 000 de dilución) Las bandas de la proteina inmunoreactiva se visualizaron usando el sistema de ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)

Calculos y Estadisticas

Los datos se informan en el texto y las figuras determinando los dpm/mg en un metabolito particular y dividiendo por la

595
509

actividad específica del HCO_3 del medio En consecuencia, todos los datos se informan como nmoles de $H^{14}CO_3$/mg de proteína para cualquier metabolito dado

Los resultados se dan como el medio ± error estándar del medio La significación estadística se juzgó con el ensayo t emparejado y un $p<0,05$ Los números de las determinaciones independientes (n) se proporcionan en leyendas en las figuras y en las tablas

RESULTADOS

Los niveles de carboxilasa de piruvato son similares en la retina y en el cerebro completo

Patel demostró que la carboxilasa de piruvato es la principal enzima fijadora del CO_2 en el cerebro de roedores adultos Para juzgar si esto también puede ser cierto en la retina, la actividad de la carboxilasa de piruvato a 37°C en sonicatos de la neocorteza fue comparada con aquellos de la retina Los niveles de la neocorteza (2,9 ± 0,1 nmoles de $H^{14}CO_3$ fijado/min/mg) fueron similares a aquellos hallados en los tejidos retinales (3,4 ± 0,4 nmoles de $H^{14}CO_3$ fijado/min/mg, lo cual indica que la carboxilasa de piruvato fue casi tan activa en la retina como en el cerebro completo

596

Velocidades de la fijación de $^{14}CO_2$ y de la apariencia del ^{14}C-glutamato en función de los niveles de piruvato en la retina

En los experimentos preliminares las retinas se incubaron con piruvato a 0,2 mM como se describio en los métodos para periodos de 10, 20, 40 y 60 minutos Se monitoreó tanto el $^{14}CO_2$ total como los niveles de ATP y de fosfato de creatina Los niveles de ATP y de fosfato de creatina permanecieron constantes en funcion del tiempo, lo cual demostro que la oxigenacion y el control del pH fueron adecuados durante todo el experimento La fijación del CO_2 total (5,50 ± 0,14 nmoles/mg de proteina) tuvo picos entre los 20 y los 40 minutos, pero ya era un 76% del máximo (4,2 ± 0,1 nmoles/mg) a los 10 minutos Como los niveles de ATP (20 ± 0,2 nmoles/mg) y de fosfato de creatina (16 ± 1,1 nmoles/mg) fueron altos y no cambiaron con el tiempo, este pico indicó que la velocidad de fijación del CO_2 fue constante, pero que la rotura continua de los productos de carbono 14 no volátiles a CO_2+H_2O produjo un nivel de estado casi estacionario de la radioactividad especifica del glutamato y la glutamina a los 20 minutos

Para estimar el control de la carboxilación de piruvato sobre la síntesis del glutamato, las retinas se incubaron con piruvato a 0,2 mM o 5 mM en el medio y se analizaron los

597 -233
509

metabolitos intracelulares y extacelulares El $^{14}CO_2$ total fijado a los 20 minutos en la presencia del piruvato a 0,2 mM fue 5,27 ± 0,45 nmoles de $H^{14}CO_3$/mg, mientras que aquel fijado en la presencia de piruvato a 5 mM fue 9,50 ± 0,74 nmoles de $H^{14}CO_3$/mg La Figura 2 muestra que el incremento en el piruvato no etiquetado desde 0,2 mM hasta 5 mM aumenta la suma de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina (de 1,74 ± 0,19 a 2,90 ± 0,31 nmoles/mg, $p<0,005$) La Figura 2 también muestra que la incubación de piruvato más elevada aumenta los valores de ^{14}C-lactato más ^{14}C-piruvato Por lo tanto, en estado estacionario, un aumento en la concentración del piruvato de 0,2 mM a 5 mM aumentó la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el glutamato y la glutamina en un 60%, mientras que el aumento en el piruvato aumentó la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el piruvato y e el lactato un 111% El carbono 14 ciclado en el piruvato y en el lactato representa el reciclado glial a través de la carboxilasa de piruvato, la enzima málica y la carboxicinasa de fosfoenolpiruvato y por primera vez demuestra la descarboxilación del ciclo del ácido cítrico activo en el tejido neural intacto

Estos datos muestran que un aumento en el flujo a través de la carboxilasa de piruvato induce un aumento en la nueva síntesis

598 T2A
570

del glutamato retinal Simultáneamente, ocurre un aumento algo mayor en el reciclado del piruvato

Una fraccion importante de la síntesis de la glutamina deriva de la carboxilacion del piruvato

La importancia de la carboxilación del piruvato como una fuente para reabastecer del glutamato liberado desde las terminaciones nerviosas retinales durante la transmisión neuronal se estimó determinando la radioactividad específica de la glutamina en el tejido retinal incubado con el medio que contiene $H^{14}CO_3$ Una proporción fija de la síntesis de la glutamina en la retina deriva del glutamato no etiquetado liberado por las neuronas y recogido por la glia de Müller El resto proviene del α-cetoglutarato glial sintetizado anapleroticamente desde el piruvato y el $^{14}CO_2$ En consecuencia, la radioactividad específica de la glutamina comparada con la actividad específica del $H^{14}CO_3$ proporciona un valor mínimo para la proporción de la glutamina derivada de la anaplerosis El producto de la carboxilasa de piruvato en la glia es [1,4-^{14}C]-oxaloacetato Las posiciones 1 y 4 se etiquetan porque el carbono 14 inicialmente incorpora en la posición 4-C del oxaloacetato se reparte al azar entre las posiciones 1 y 4 mediante el equilibrio del oxaloacetato con fumarato asimétrico El oxaloacetato etiquetado se condensa

599
571

con piruvato para formar citrato, que luego se isomeriza hacia isocitrato El [1,4-^{14}C]-isocitrato es oxidado y descarboxilado hacia el [5-^{14}C] α-cetoglutarato por la deshidrogenasa de isocitrato En consecuencia, el α-cetoglutarato sintetizado anaplerόticamente tiene aproximdamente la mitad de la radioactividad especifica del $H^{14}CO_3$ del sústrato original, según el grado de selección al azar de la etiqueta en el oxaloacetato Esto también es cierto para la glutamina sintetizada desde el [5-^{14}C] α-cetoglutarato

La actividad específica de la glutamina se midió en los extractos de tejido retinal incubados con piruvato a 0,2 mM y $H^{14}CO_3$ para los 10, 20, 40 y 60 minutos Solamente se informa la glutamina del tejido (no del medio La radioactividad especifica de la glutamina en el tejido fue constante entre los 10 y los 60 minutos Después de 20 minutos de incubación la cantidad de masa de glutamina en el tejido fue de 4,50 ± 0,44 nmoles/mg, y su radioactividad específica fue de 1 970 ± 115 dpm/nmol o de 0,158 ± 0,009 dpm/nmol de la actividad específica del bicarbonato Esto indica que un 32% de la glutamina fue producida por la anaplerosis y la carboxilasa de piruvato

La radioactividad espcífica del glutamato retinal (269 ± 8 dpm/nmol) fue menor que la de la glutamina y también constante

600
512

en función del tiempo desde los 10 a los 60 minutos Fue sólo del 14% de la actividad espcífica de la glutamina Esto sugiere que la devolución metabólica del glutamato en las neuronas es rápida con respecto a la síntesis anaplerótica Sin embargo, como la devolución de glutamato neuronal no puede reabastecer del esqueleto de carbono de glutamato perdido durante la neurotransmisión, la via anaplerótica es de fundamental importancia en el mantenimiento de los niveles de glutamato Los presentes datos muestran inequívocamente que la via anaplerótica proporciona una importante proporción (≈32%) de la glutamina requerida para el reabastecimiento de glutamato

La sintesis del glutamato y la glutamina retinales depende parcialmente de la transaminacion de los aminoácidos de cadena ramificada

Estudios recientes de la síntesis del glutamato en astrocitos cultivados sugirieron que la conversión del α-cetoglutarato al glutamato puede actuar como un paso de control de la velocidad en la síntesis anaplerótica del glutamato Varios grupos han indicado que el grupo α-amino del glutamato no puede ser suministrado como amoniaco y debe en consecuencia ser suministrado por la transaminación del α-cetoglutarato con

601
513

otro aminoácido Kanamori, K , Ross, B D , y Kondrat, R W (1998) *J Neurochem* 70, 1304-1315, Laemmli, Reino Unido (1970) *Nature* 227, 680-685, que incluye Haberg, A , Qu, H , Bakken, I J , Sande, L M , White, L R , Haraldseth, O , Unsgard, G , Assley, J , Sonnewald, U (1998), de nuestra autoría, *Dev Neurosci*, 20, 389-398 Los aminoácidos de cadena ramificada contribuyen con hidrógeno igualmente ya que pueden atravesar las barreras sangre-cerebrales y sangre-retinales eficientemente Hutson y sus colaboradores han propuesto que una lanzadera de nitrógeno entre las neuronas y la glia que consiste en aminoácidos de cadena ramificada y dos isoenzimas de BCAT, una en el citosol neuronal (BCATc) y una en la mitocondria glial (BCATm), tambien puede proporcionar también el nitrógeno necesario Hutson, S M , Berkich, D , Down, P , Xu, B , Aschner, M , y LaNoue, K F (1998) *J Neurochem* 71, 863-874 De acuerdo con esta lanzadera hipotética, la BCATc neuronal facilita la conversión por la BCATm glial del α-cetoglutarato en el glutamato proporcionando BCAA regenerado en las neuronas (cf Figura 1)

Como un primer paso hacia la investigación del rol de las isoenzimas de BCAT en la nueva síntesis del glutamato en la retina, se uso la inmunotransferencia con anticuerpos específicos de BCATm y BCATc para determinar si las isoenzimas de BCAT se expresan en la retina de las ratas Como se muestra

en la Figura 3, tanto la BCATc como la BCATm se expresan en la retina a niveles que son comparables con aquellos hallados en homogenatos de cerebro completo En consecuencia, la retina de rata recién disecada es un sistema neural intacto apropiado en para ensayar el concepto del lanzamiento de nitrógeno entre las neuronas y la glia

La gabapentina análoga de leucina (GBP) es una droga neuroactiva que inhibe la BCATc, pero no la BCATm Su, T -Z , Lunney, E , Campbell, G , Oxender, D L (1995) *J Neurochem* 64, 2125-2131 Se confirmó que la GBP inhibe la síntesis de la leucina en las retinas de rata recién disecadas (no se muestran datos) Se midió entonces el efecto de la GBP sobre la síntesis de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ en retinas de rata fuera del cuerpo vivo Como se muestra en la Figura 4, la GBP a 1 mM redujo la formación de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina al 71% de los valores de control (2,26 ± 0,05 contra 3,18 ± 0,12 nmol/mg, $p<0,001$) El agregado de 200 µM cada uno de leucina, isoleucina y valina invirtió la inhibición al 89% del control (2,84 ± 1,15 nmol/mg, $p<0,01$ comparada con la GBP sola) La GBP no tuvo ningun efecto sobre ATP ni sobre el fosfato de creatina, lo cual indica que la GBP no deterioró los procesos bioenergéticos retinales El pequeño aumento en la incorporacion de carbono 14 en los intermedios

239
SHP
603

del ciclo del lactato y del ácido cítrico (de 1,93 ± 0,06 a 2,12 ± 0,13) debido a que la presencia de GBP a 1 mM no era significativa La incorporación de la etiqueta en todos los metabolitos se muestra en la Tabla II

Se realizaron otros experimentos para investigar las propiedades de respuesta a la dosis de la GBP Las retinas recien disecadas se incubaron durante 20 minutos en el tampón A que contenía GBP a 0, 0,2, 1 o 5 mM Como se muestra en la Figura 5, el aumento de la concentración de la GBP en 1 mM no aumentó significativamente el grado de esta inhibición de la síntesis de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ Nuevamente la GBP no tuvo ninguna influencia sobre la formación de intermedios de ciclo de ácido citrico, lactato y piruvato (Figura 5) Esto apoya la propuesta de que el sitio de inhibicion de GBP de la síntesis del glutamato es la conversión mediada por BCAT del α-cetoglutarato al glutamato

DISCUSION

Los estudios descriptos evaluaron los mecanismos para mantener los niveles de glutamato en el sistema nervioso central Los estudios previos mostraron que la sintetasa de glutamina es requerida en las retinas y los cortes del hipocampo para

240

SH6 604

mantener los niveles de glutamato neuronal Su, T -Z , Lunney, E Campbell, G , Oxender, D L (1995) *J Neurochem* 64, 2125-2131

Las mediciones inmunocitoquimicas indican que el 90% o más del glutamato retinal y del cerebro completo es neuronal y que la inhibición de la sintetasa de glutamina para los 90 minutos agota la fuente de glutamato neuronal a niveles despreciables Ottersen, O P , Zhang, N , y Walberg, F (1992) *Neurosci* 46, 519-534 Esto demostró que la sintetasa de glutamina es requerida para mantener el glutamato neuronal Aunque el glutamato se puede sintetizar en las neuronas desde el α-cetoglutarato, la falta de carboxilasa de piruvato u otra enzima anaplerótica impide el reabastecimiento de α-cetoglutarato, y por lo tanto, impide la síntesis de glutamato neto dentro de las neuronas, salvo desde la glutamina a través de la glutaminasa

En este ejemplo, las fuentes y el control de la síntesis de la glutamina se investigó incubando retinas extirpadas con $H^{14}CO_3$ y midiendo la apariencia y la radioactividad especifica de la ^{14}C-glutamina y el ^{14}C-glutamato Se sintetiza más ^{14}C-glutamina en presencia de piruvato a 5 mM que en presencia de 0,2 mM Esto indica que la actividad de la carboxilasa de piruvato

SAF 605

influye en la velocidad de la síntesis de la glutamina Sin embargo, la sensibilidad de este control es demostrada por la observacion de que cuando el piruvato se incrementa de 0,2 mM a 5 mM, la magnitud del incremento en el flujo de la carboxilasa de piruvato (80,3%) no se traduce directamente en un aumento equivalente en el ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina (69,0%) La flexibilidad del control es provista por el potencial de descarboxilación del ciclo del ácido cítrico y el reciclado del piruvato La dependencia del piruvato de la fijación total de $H^{14}CO_3$ en el tejido retinal fue similar a la observada en los astrocitos aislados cultivados Gamberino, W C , Berkich, D A , Lynch, C J , Xu, B , y LaNoue, K F (1997) *J Neurochem* 69, 2312-2325 Sin embargo, en los astrocitos, que no tienen ningun modo de regenerar BCAA endógena usada para transaminar el α-cetoglutarato, los aumentos inducidos por el piruvato en la fijación del CO_2 no se tradujeron en aumentos en los niveles de ^{14}C-glutamato y ^{14}C-glutamina En cambio, el carbono 14 se acumuló exclusivamente en los intermedios del ciclo de ácido cítrico y en el piruvato "reciclado"

En los estudios retinales informados aquí, la radioactividad específica de la glutamina en el estado estacionario fue 0,158 de la actividad específica del bicarbonato Como aproximadamente la mitad del ^{14}C incorporado en el oxalacetato

SFB 606

es retenida en el α-cetoglutarato, los resultados muestran que ≈32% de la glutamina deriva de $H^{14}CO_3$ Ésta es la primera estimación directa de la contribución de la anplerosis a la síntesis de la glutamina en un tejido neuronal Las estimaciones anteriores han sido indirectas, y consistieron en el análisis isotopomérico de los espectros de NMR posteriores a la infusión de ^{13}C glucosa (3-5, 11-13) en cerebros intactos Las estimaciones de la contribución de la carboxilación del piruvato a la síntesis de la glutamina usando estos métodos de NMR han sido menores que la presente, y están en la gama de menos del 1% (3) al 5%-10% (4,5) al 20%-25% Shank, R P , Bennet, G S , Freytag, S O y Campbell, G L (1985) *Brain Res* 329, 364-367, Griffen, J L , Rae, C , Radda, G K , y Matthews, P M (1999) *Biochim Biophys Acta* 1450, 297-307, lo cual depende en gran medida de las suposiciones iniciales de los modelos matemáticos usados Los presentes resultados sugieren que la carboxilación del piruvato glial y la conversión de los intermedios del ciclo del ácido cítrico al glutamato y la glutamina probablemente sean cuantitativamente importantes para la función retinal y posiblemente para la función cerebral completa

La observación de que la GBP hace más lenta la conversión de los intermedios del ciclo del ácido cítrico en glutamina y

glutamato sugiere que la síntesis neuronal de la BCAA por la BCATc es necesaria para las velocidades óptimas de la aminación del α-cetoglutarato al glutamato Un esquema razonable para su participación en este proceso se muestra en la Figura 1

Los resultados, que demuestran la inhibición de la síntesis del ^{14}C-glutamato y la 14C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ por la GBP y la inversión de la inhibición por la BCAA son consistentes con la lanzadera descipta La hipótesis también da una explicación para la acción antiepiléptica de la GBP Taylor, C P , Gee, N S , Welty, D F , Brown, J P , Dooley, D J , Boden, P , Singh, L (1998) *Epilepsy Res* 29, 233-249 De hecho, la síntesis del glutamato disminuida es una accion comun de la GBP y los inhibidores de la anhirasa carbónica antiepiléptica Hazen, S A , Waheed, A , Sly, W S , LaNoue, K F , Lynch, C J (1997) *Dev Neurosci* 19, 162-171 También, la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce, la enfermedad hereditaria causada por una mutación del gen para la deshidrogenasa del cetoácido de cadena ramificada, si no es tratada induce una alta BCAA en suero en pacientes y consecuentes anormalidades neurológicas Chuang, D I , y Shih, V E (1995) en *La Base Metabolica de la Enfermedad Hereditaria*, eds Schriver, C R , Beaudet, A L , Sly, S , y Vaile, D (McGraw-Hill) páginas 1239-1277, que puede estar relacionada con la regulación anormal de la

520/608

síntesis del glutamato Finalmente la implicación del lanzamiento del nitrógeno durante la síntesis del glutamato debe ser estudiada más profundamente a la luz de la eficacia de la GBP en el tratamiento de la enfermedad neuropática Ottersen, O P , Zhang, N y Walberg, F (1992) *Neurosci* 46, 519-534 y la neurodegeneración, Chuang, D I y Shih, V E (1995) en *La Base Metabolica de la Enfermedad Hereditaria*, eds Schriver, C R , Beaudet, A L , Sly, S y Vaile, D (McGraw-Hill), páginas 1239-1277, Rothsetin J D y Kunel, R W (1995) *J Neurochem* 65, 643-651

EJEMPLO 67

Preparación de Enzimas Cerebros de rata congelados fueron fundidos en hielo y desmenuzados en trozos finos Para cada cerebro se agregaron 5 ml de un tampón isotónico [manitol a 225 mM sucrosa a 75 mM, MOPS a 5 mM (pH 7,1), EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, DTT a 1 mM, que contenía leupeptina, pepstatina y PMSF] Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador de Potters (B Bran Biotech International) a 500 rpm durante diez pulsaciones, y luego diez pulsaciones adicionales a 800 rpm Los homogenatos se centrifugaron en el centrifugador Beckman J2-M1 con rotor JA-20 a 19 000 rpm durante 1 hora El sobrenadante se dializó con al menos tres cambios del tampón de diálisis (manitol a 225 mM, sucrosa a 75 mM, MOPS a 5 mM a

pH 7,1, EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, y DTT a 1 mM) durante 24 horas La enzima resultante se almacenó a -80°C para otros ensayos

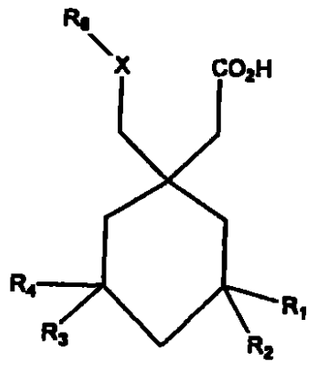
Ensayo de la BCAT La reacción se realizó en tubos de Eppendorf de 1,5 ml en un volumen de 100 µl que contenía Tris-HCl a 50 mM (pH 8,3), [^{14}C]L-leucina a 25 µM, 2-oxoglutarato a 10 µM, fosfato de piridoxal a 15 µM, DTT a 1 mM, y enzima Las soluciones para la mezcla de la reacción se hicieron en diez veces las concentraciones Pasados 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (22°C), la reacción fue detenida agregando 100 µl de p-nitrofenil hidrazina a 15 mM en HCl a 2 M Pasados unos minutos se agregó 1 ml de un líquido de centelleo basado en tolueno (4,5 g de PPO y 0,5 g de bis-MSB en 1 litro de tolueno), se tapó el tubo y se mezcló completamente con un mezclador de Vortex Luego los tubos se centrifugaron a 13 500 rpm (centrifugador de Eppendorf 5415C) durante 10 minutos Se colocaron 600 µl de la capa orgánica de cada tubo en tubos de centelleo, y luego se agregaron 10 ml de cóctel de centelleo para el recuento

296

822 610

REIVINDICACIONES

1 Un compuesto de la Fórmula IV



IV

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrógeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmaceuticamente aceptable de él

2 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son alquilo, R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es alquilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, X es O, R_6 es

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

227
523611

alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenialquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

3 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenilalquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

4 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R^4 son hidrógeno

5 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se selecciona del grupo formado por

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

243

524612

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acético,

SERGIO EYEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2639 Minjusticia 1 991

249

525613

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acetico,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acetico,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acetico,

SERGIO EL EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

526614

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

SERGIO EZEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

252

527615

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

752

528616

Sal de clorhidrato del ácido (1-propılaminometıl-cıclohexil)-acétıco,

Sal de clorhıdrato del ácıdo [1-(ısopropılamino-metıl)-cıclohexıl]-acétıco,

Sal de clorhıdrato del ácıdo (1-cıclohexılamınometıl-cıclohexıl)-acétıco, y

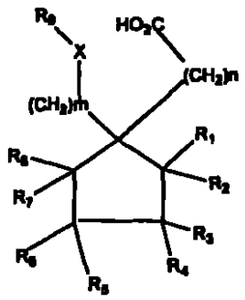
Sal de clorhıdrato del ácıdo [1-(bencılamıno-metıl)-cıclohexıl]-acétıco

6 Un método para tratar la retınopatía diabétıca, caracterızado porque comprende el paso de admınıstrar una cantıdad terapéutıcamente efectıva de un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, a un paciente que lo necesita

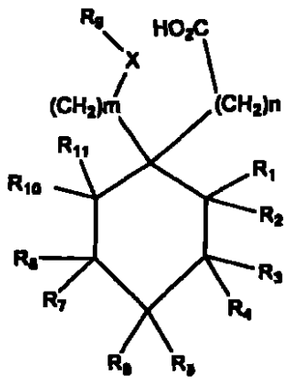
SERGIO EL EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

253

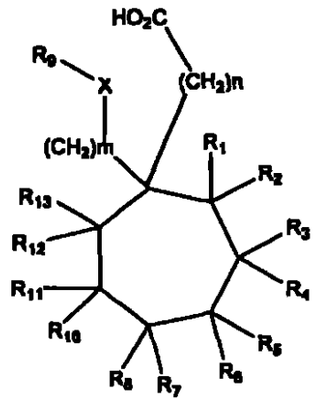
529617



I



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halógeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

25A

530
618

alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un número entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

X = NR_{14}, O, o S,

cuando hay más de un estereoisómero, cada centro quiral puede ser independientemente R o S, o una sal, éster, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

7 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H, R_9 es alquilo R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H, R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

8 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrogeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es O

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2639 Minjusticia 1 991

537
619

9 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el compuesto se selecciona del grupo formado por

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete
Resol No 2839 Marjusticia 1991

256

522
620

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del acido trans-(1R,3R)(1-Aminomêtil-3-metil-ciclohexil)-acético,

SERGIO EZEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

621
S33

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusbcia 1 991

622
S34

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acetico,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

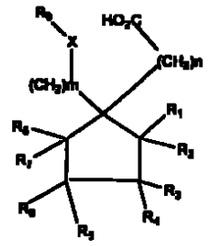
Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

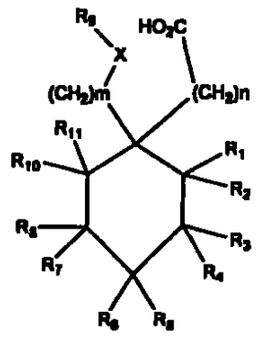
10 Un método para inhibir la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada en un paciente que lo necesita, caracterizado porque comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

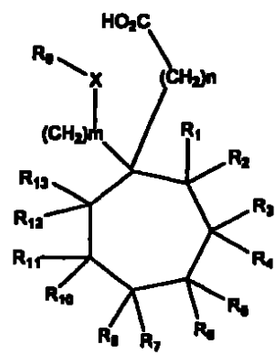
624
536



I



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halógeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo, alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un numero entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

625
537

X = NR_{14}, O, o S,

cuando hay más de un estereoisomero, cada centro quiral puede ser independientemente R o S, o una sal, éster, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

11 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H, R_9 es alquilo, R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H, R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

12 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es O

13 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto se selecciona del grupo formado por
Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

626
588

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1991

627 263
539

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

628

SAB

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

629
541

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO EZEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

630 266
542

Sal de clorhidrato del acido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del acido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

14 Un método para tratar trastornos neurológicos, depresión, ansiedad, pánico, manías, trastornos bipolares, enfermedades antiinflamatorias, glaucoma, dolor o lesion gastrointestinal, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula IV a un paciente que lo necesita

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrógeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmacéuticamente aceptable de él

SERGIO EL EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

631 S43

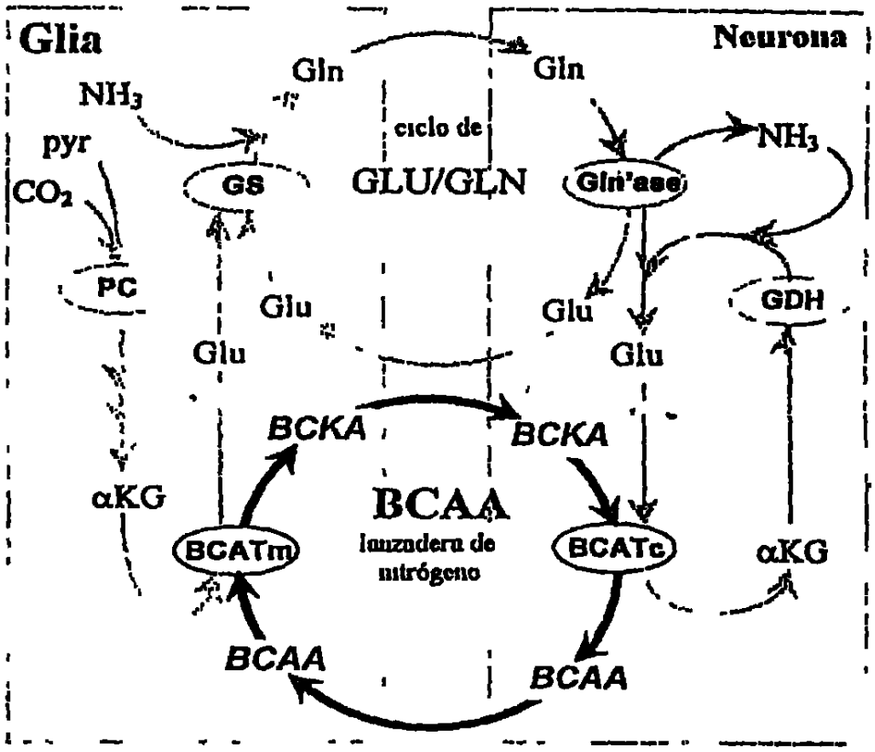
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatía diabética El método consiste en la administración de un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT), a un animal, tal como un mamífero, en particular un humano, en una cantidad suficiente para tratar profiláctica o terapéuticamente la retinopatia diabetica La presente invención también se refiere a varios inhidores novedosos de la vía de la BCAT ----

632

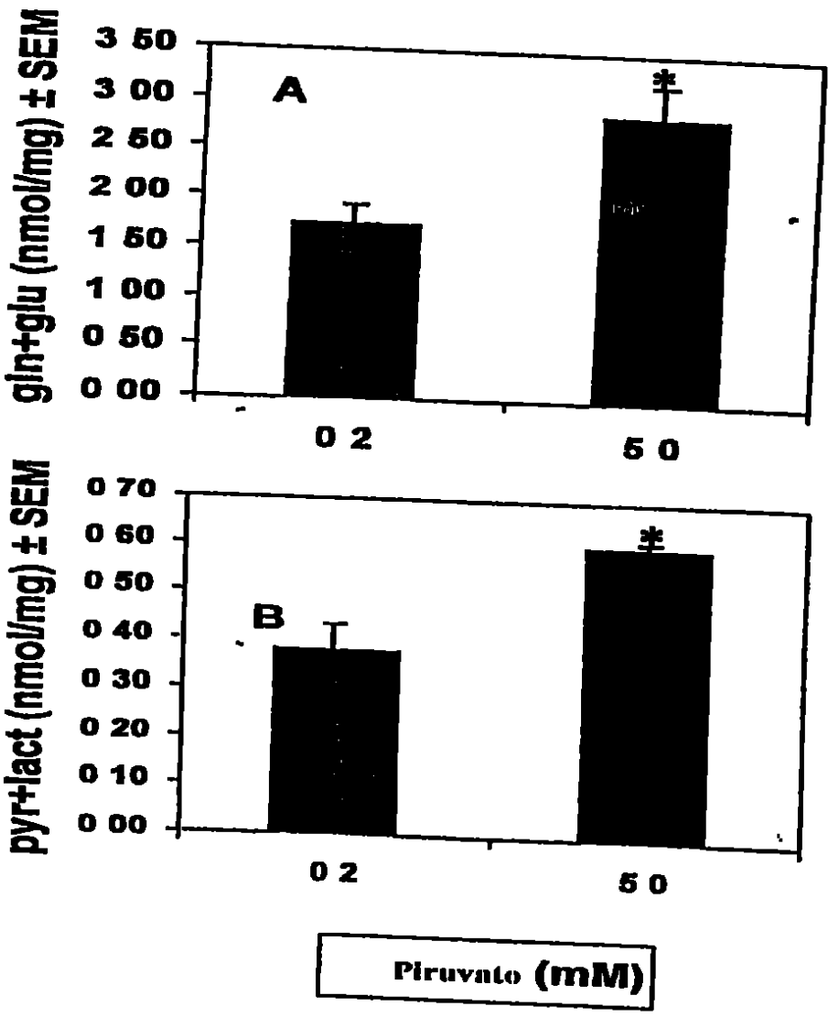
544

Figura 1



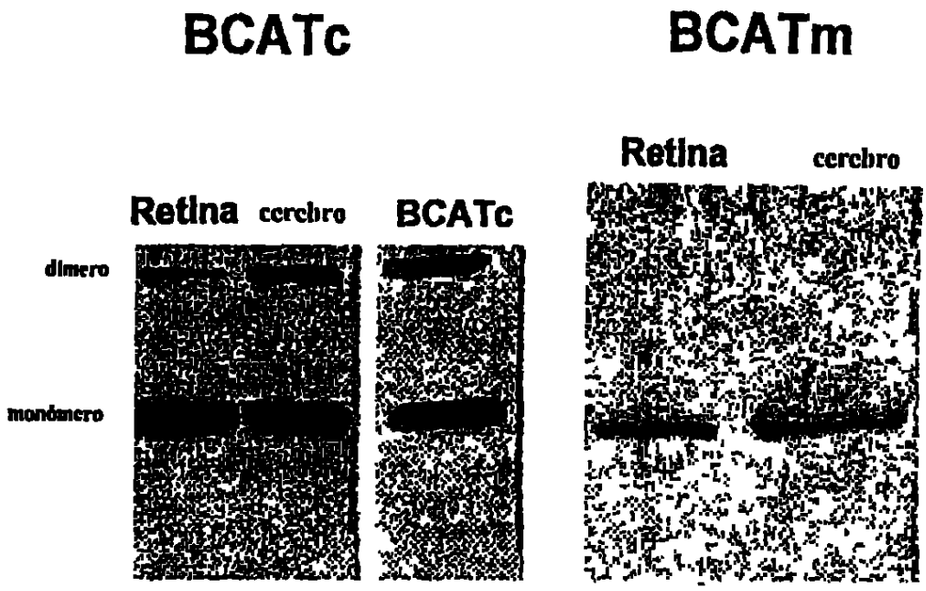
633 569
545

Figura 2



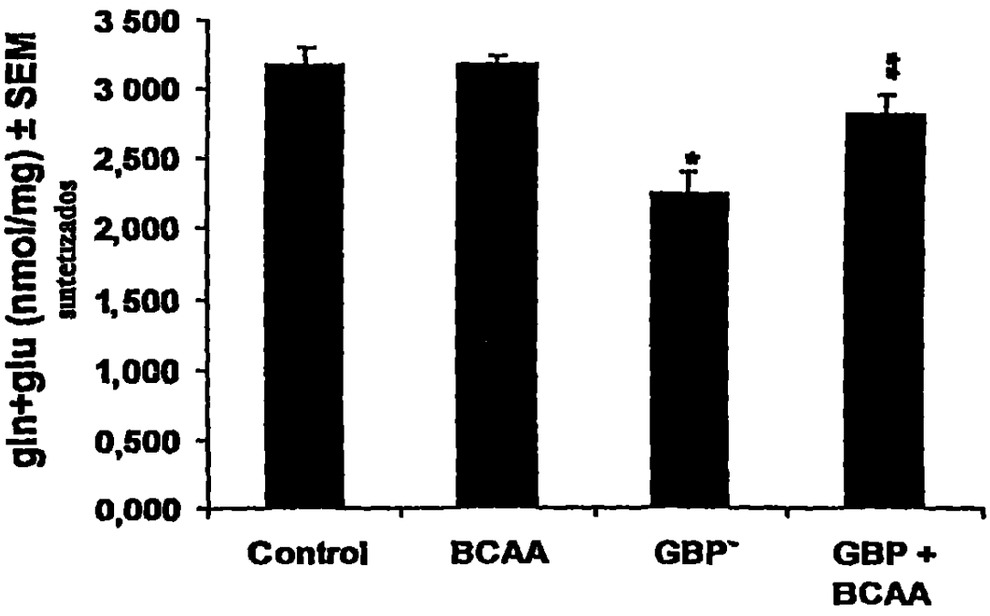
634
540

Figura 3



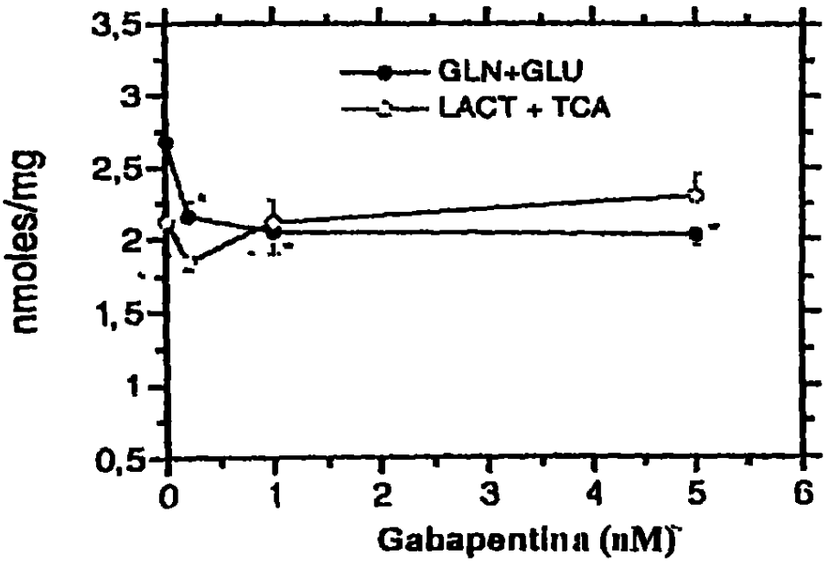
635 272
347

Figura 4



636 ~~892~~
~~SA8~~

Figura 5



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

649/273
637

Miami, 31 Octubre 2000 AUTENTICACION No 6866

El Consul General CERTIFICA que el(la) señor(a) KATHERINE HARRIS *** que autoriza el documento adjunto, ejercía legalmente en la fecha allí expresada las funciones de SECRETARIO ESTADO y que la firma y sello que aparecen en el documento como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales
El Consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento

Por el Cónsul General,

DERECHOS Timbre US$ 7.00
Fondo Rot US$ 15 00

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

493963

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

A black and white copy of this document is not official

12 844

638

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 Country: United States of America

This public document

2. has been signed by Felicia Artiles

3. acting in the capacity of Notary Public of Florida

4 bears the seal/stamp of Notary Public, State of Florida

Certified

5. at Tallahassee, Florida

6. the Twenty-Fourth day of October, A.D., 2000

7. by Secretary of State, State of Florida

8. No. 2000-23182

9. Seal/Stamp: **10. Signature:**

Katherine Harris

Secretary of State

DSDE 99 (1-99)

If photocopied or chemically altered, the word "VOID" will appear

"State of Florida" appears in small letters across the face of this 8½ X 11" document

This document contains an artificial watermark on REVERSE Hold at 45° DO NOT ACCEPT UNLESS VIEWED

Colombey
5
639

FA 301845

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

September 21, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111

APPLICATION NUMBER ***60/175,399***
FILING DATE ***January 11, 2000***

FELICIA ARTILES
Notary Public - State of Florida
My Commission Expires Nov 7 2003
Commission # CC886298

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

N WILLIAMS
Certifying Officer

1-12-2000

A.PROV

Please type a plus sign (+) inside this box → [+]

Docket Number	A99918/L2-81MJA

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT C VER SHEET (Large Entity)

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53 (c).

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Justin Stephen	Bryans	Dean College, 3 W. Wickham Rd., Baldock CB1 8DZ, UK
Lain-Yen	Hu	4991 S. Ridgeside Circle, Ann Arbor, Michigan 48105
Susan M.	Hutson	1123 W. 4th St., Winston-Salem, North Carolina 27101
Kathryn Foley	Lalieux	417 Hilltop Rd., Hummelstown, PA 17036

☒ *Additional inventors are being named on page 2 attached hereto*

TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

CORRESPONDENCE ADDRESS

Direct all correspondence to.

☐ Customer Number [ ] → *Place Customer Number Bar Code Label here*

OR

☒ Firm or Individual Name	Michael J. Atkins				
Address	Warner-Lambert Company				
Address	2800 Plymouth Road				
City	Ann Arbor	State	Michigan	ZIP	48105
Country	U.S.A.	Telephone	(734) 622-5218	Fax	(734) 622-1553

ENCLOSED APPLICATION PARTS *(check all that apply)*

☒ Specification — *Number of Pages* 80

☒ Drawing(s) — *Number of Sheets* 5

☒ Other (specify) — 13 Claims on 10 pages, Abstract on 1 Page

METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT *(check one)*

☒ A check or money order is enclosed to cover the filing fees — FILING FEE AMOUNT: $150.00

☐ The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 23-0455

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No.

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,

SIGNATURE Michael J Atkins DATE 1/11/00

TYPED or PRINTED NAME Michael J. Atkins REGISTRATION NO. *(if appropriate)* 35,431

TELEPHONE (734) 622-5218

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231

PTO/SB/16 (4-98)

01/11/00 jc575 U.S. PTO 60/175399 01/11/00

Express Mail No. EJ676055115US

50175399 - 011100

553
641

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT C VER SHEET (Large Entity)

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (city and either State or Foreign Country)
Erich	Lloth	1435 Bradley Ave., Hummelstown, PA 17036
Michael Francis	Rafferty	3711 Rolling Ridge Court, Ann Arbor Michigan 48105
Todd Robert	Ryder	621 N. Ashley Street, Ann Arbor, Michigan 48103
Ti-Zhi	Su	2519 Meade Court, Ann Arbor Michigan 48105
Devin Franklin	Welty	2213 Placid Way, Ann Arbor, Michigan 48105

60175299 .011100

Certificate of Mailing by Express Mail

I certify that this provisional patent application cover sheet, provisional patent application and fee is being deposited on 11/11/2000 with the U.S. Postal Service as "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. 1.10 and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

Signature of Person Mailing Correspondence

Linda A. Zerby

Typed or Printed Name of Person Mailing Correspondence

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

SEND TO: Box Provisional Application, Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231

554
642

A0000151L2-01MJA

60175299.011100

EXPRESS MAIL NO. EM076051508US

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

555
643

BRANCHED CHAIN AMINO ACID-DEPENDENT AMINOTRANSFERASE INHIBITORS AND THEIR USE IN THE TREATMENT OF DIABETIC RETINOPATHY

BACKGROUND OF THE INVENTION

More than 14 million people in the United States have diabetes. All people with diabetes are at risk of retinal complications However, people with type I, i.e., insulin-dependent, diabetes, face a greater risk of severe vision loss than people with type II, i.e., non-insulin dependent, diabetes.

Initially, the high blood glucose level in diabetic people causes an increase in growth factors in their eyes. This condition is known as the "pre-diabetic retinopathy stage" and can lead to retinopathy, if not prophylactically treated.

Retinopathy will affect the majority of diabetic people to some extent during their lifetimes (Anonymous, MMWR 42(10) 191-195 (1993)) It is the leading cause of blindness in Americans of age 20 to 74 today and is expected to impair vision in approximately one-third of diabetic people in the United States. Each year in the United States, as many as 40,000 new cases of blindness occur among diabetic people (CDC, unpublished data, 1993). Diabetic people are 25 times more likely than the general population to become blind due to retinopathy

Diabetic retinopathy has two stages-a nonproliferative stage, which typically occurs first, and a proliferative stage. The nonproliferative stage, which is also referred to as "background diabetic retinopathy," is characterized by thickening of the basement membrane, loss of retinal pericytes, microvascular abnormalities, intraretinal microaneurysms, retinal hemorrhages (also known as "dot blot" hemorrhages), retinal edema, in particular diabetic macular edema, capillary closure associated with retinal ischemia or poor retinal perfusion (i.e., poor vessel development) and soft and hard exudates. The proliferative stage, which affects an estimated 700,000 Americans (Chen et al., J Miss. State Med. Assoc. 36(7) 201-208 (1995)), is characterized by neovascularization and fibrovascular growth (i.e., scarring involving glial and fibrous elements) from the retina or optic nerve over the inner surface of the retina or disc or into the vitreous cavity

501755699 -011100

550 644 200

The proliferative stage can lead to rubeotic or neovascular glaucoma. Macular edema can occur in either stage and it, along with complications from retinal neovascularization, are the two major retinal problems that cause the diabetes-related vision loss.

While the pathological stages of diabetic retinopathy are well-described, the molecular events underlying diabetic retinopathy are poorly understood. This is due, in part, to the fact that the disease progresses over ten to thirty years, depending on a given individual.

Tight control of glycemia and hypertension and ophthalmic screening of diabetics appears beneficial in preventing the disease. Current treatment consists of regular observation by an ophthalmologist, laser photocoagulation and vitrectomy

Macular edema threatening or involving the macular center is treated with focal macular photocoagulation. Small (50 mu in diameter), mild-intensity laser burns are targeted at areas of leakage in the macula (Murphy, Amer Family Physician 51(4) 785-796 (1995)) If the macular edema persists, retreatment may be necessary

Patients with severe to very severe nonproliferative retinopathy and patients, who are at high risk for proliferative retinopathy or who already have early or advanced proliferative retinopathy, are treated with scatter or panretinal photocoagulation. Panretinal photocoagulation involves 1,500-2,000 laser burns, which are 500 mu in diameter, in the midperipheral and peripheral portion of the retina (Murphy (1995), supra).

The best-documented biochemical mechanism for the development of microvascular complications of diabetes is the sorbitol pathway In the sorbitol pathway, the enzyme aldose reductase catalyzes the conversion of glucose to sorbitol and galactose to galactitol. Aldose reductase has a low substrate affinity for glucose. Accordingly, when glucose concentrations are normal, the pathway is inactive. During hyperglycemia, the sorbitol pathway becomes active. Activation of the sorbitol pathway is important for retinal pericytes, for example, which do not require insulin for glucose penetration. Similarly, retinal capillary cells appear to contain substantial amounts of aldose reductase (Ferris, Hospital Practice: 79-89 (May 15, 1993))

WO 96/17599 PCT/US95/15100

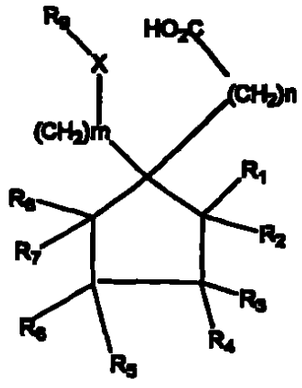
557
645

Given the prevalence of diabetic retinopathy, there remains a need for an effective prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy. Accordingly, it is a principal object of the present invention to provide a method of prophylactically and therapeutically treating diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. This and other objects of the present invention will become apparent from the detailed description provided herein.

WO 00/75299 PCT/US00/15705

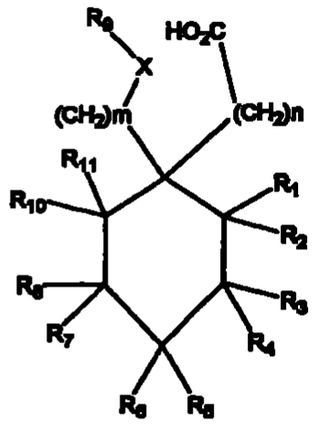
SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. The method involves the administration of an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway. Preferably, the inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway is a compound of Formulas I, II, and/or III

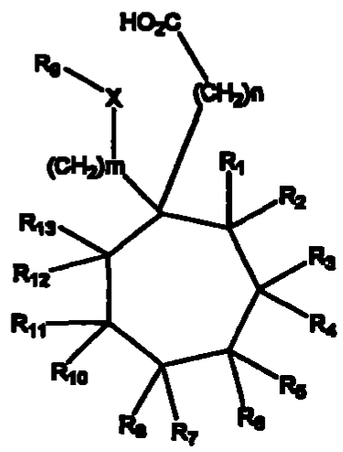


I

558 646 -82



II



III

wherein

R9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

00117599 - 66257103

559
647

$R_1 - R_9$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

$X = NR_{14}$, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof

Preferred compounds are those of Formula I, II, or III wherein m and n are 1, X is N_{R14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_8 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_8 are H, or R_2 is methyl.

More preferred compounds are those of Formula II wherein R_3 is alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

Especially preferred compounds are selected from:

(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

WO 01/75399 PCT/US01/11109

trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Ammomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
trans-(1R,3R)(1-Ammomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Ammomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Ammomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(±)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,
(cis/trans)-(3R)-(1-Ammomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

EP 1753399 B1 2011-11-09

(+)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

(+)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride,

1α,3β,5β-(1-Ammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-Butylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylammomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[1-(Acetylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-(Isobutylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylammo-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

0017529 99 "011100

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,

1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

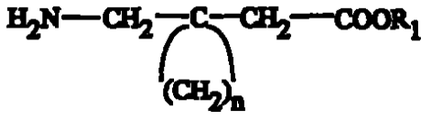
(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

Several of the compounds described by Formulas I, II, and III are known. Compounds of Formula A.

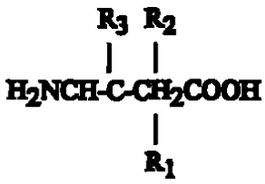


A

563
651

wherein R_1 is hydrogen or a lower alkyl radical and n is 4, 5, or 6 are known in United States Patent Number 4,024,175 and its divisional United States Patent Number 4,087,544 The uses disclosed are: protective effect against cramp induced by thiosemicarbazide; protective action against cardiazole cramp, the cerebral diseases, epilepsy, faintness attacks, hypokinesia, and cranial traumas, and improvement in cerebral functions. The compounds are useful in geriatric patients. The patents are hereby incorporated by reference.

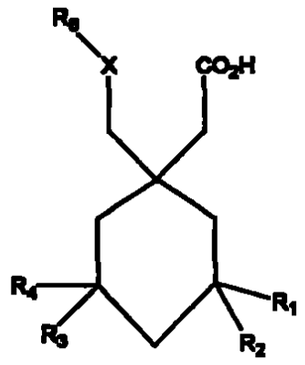
Compounds of Formula B



B

or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein R_1 is a straight or branched alkyl group having from 1 to 6 carbon atoms, phenyl or cycloalkyl having from 3 to 6 carbon atoms, R_2 is hydrogen or methyl, and R_3 is hydrogen, or carboxyl are known in United States Patent Number 5,563,175 and its various divisionals These patents are hereby incorporated by reference.

The present invention also discloses novel compounds of the Formula IV



IV

DOTTO" 69E5409 "0117500

564
652

R_1-R_4 are hydrogen or alkyl,
X is NR_5 or O;
R_5 is hydrogen or alkyl,
R_6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R1-R4 are each hydrogen then R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof Like the comounds of Formulas I, II, and III, the compounds are useful for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage.

Preferred compounds are those of Formula IV wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are alkyl, R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen; R_1 is alkyl and R_2-R_4 are hydrogen; R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen; X is NR_6; X is O, R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl.

Other preferred compounds are those of Formula IV wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6; R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl.

Especially preferred compounds are selected from.
(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

001752999 .0111.00

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

001752999.011100

566
654

1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Dimethylammomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylammo-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,
{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-(Isopropylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,
{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;
{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,
(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;
{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

EP1753399 "01100

567 655 892

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

The present invention is also a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of one or more compounds of Formula IV and a pharmaceutically acceptable carrier

Compounds of Formula II, such as gabapentin, are useful for treating various conditions such as neurodegenerative disorder (US 5,084,479), depression (US 5,025,035), anxiety/panic (US 5,792,796), mania/bipolar disorders (US 5,510,381), anti-inflammatory diseases (WO 98 158641), gastrointestinal damage (WO 99 108670), glaucoma, and pain. Because the compounds of Formula II and Formula IV both operate to affect the branch chain amino acid-dependent aminotransferase pathway and affect the synthesis of glutamate, which is involved in each of the aforementioned indications, the compounds of Formula IV will also be useful for the treating the indications. Thus, the present invention is also directed to the use of the compounds of Formula IV to treat each or more than one of neurodegenerative disorders (including but not limited to ALS, Parkinson's disease and Alzheimer's disease), depression, anxiety/panic, mania/bipolar disorders, anti-inflammatory diseases, glaucoma pain, or gastrointestinal damage.

02752299 "0111100

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Scheme showing the BCAA shuttle in the retina. The shuttle proper is highlighted and shows how branched chain amino acids in the

568 656 92

glu can transaminate α-ketoglutarate to form glutamate The BCKA product diffuses across the interstitium (shown as grey) to the neurons where it is converted back to the branched chain amino acid by transamination with glutamate via BCATc. Abbreviations are as follows. BCAA=branched chain amino acid, GLU=glutamate; GLN=glutamine; Gln'ase=glutaminase; pyr=pyruvate; PC=pyruvate carboxylase, αKG=α-ketoglutarate, BCATm=mitochondrial branched chain aminotransferase, BCATc=cytosolic branched chain aminotransferase; BCKA=branched chain keto acid, GDH=glutamate dehydrogenase.

Figure 2. Effect of pyruvate concentration on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate plus glutamine (A) and pyruvate plus lactate (B) by *ex vivo* retinas. Hemi-retinas were incubated at 37°C under standard conditions with 25 mM $H^{14}CO_3$ for 20 minutes. Pyruvate in the medium was either 0.2 or 5 mM. Values shown are mean ± SEM (n=4, * $p<0.05$). Abrevs gln+glu = sum of labeled glutamine plus glutamate; pyr+lact = sum of labeled pyruvate plus lactate.

Figure 3. Expression of BCAT isoenzymes in rat retina. Tissue extraction, SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described using the ECL detection kit. Immunoaffinity purified rat anti-BCATc peptide antibody (1 1000) and human anti-BCATm antibody (1 1000) were used.

Figure 4. The influence of gabapentin (GBP) and branched chain amino acids on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate plus glutamine by *ex vivo* retinas. Half retinas were incubated at 37° C under standard conditions with 25 mM $H^{14}CO_3$ and 0 2 mM pyruvate for 20 minutes. In some instances gabapentin (1 mM) was included in the incubation medium and in others GBP (1 mM) plus all three branched amino acids (0.2 mM) each were included Values shown are means ± SEM of HCO_3 incorporated into

6017523999 011100

569 657

glutamate plus glutamine in 20 minutes (n=4, * p<0 001, ** p<0 01)
Abrevs gln+glu = sum of labeled glutamine plus glutamate

Figure 5. Influence of gabapentin (GBP) concentration on incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate and glutamine in *ex vivo* retinas. Conditions were similar to those of Figure 4 except for the concentration of GBP Values shown are means ± SEM (n=6-7, * p<0 05) Abrevs. GLN+GLU = sum of glutamine plus glutamate; LACT + TCA = sum of lactate plus TCA cycle intermediates.

EP 0752899 A1 I

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is predicated on the discovery that intraocular glutamate injection causes ganglion cell loss which is related to the early stages of diabetic retinopathy (Vorwerk et al IOVS 37 1618-1624 (1996)) and that an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway, specifically gabapentin, is effective in inhibiting the synthesis of glutamate (see example below), thus preventing diabetic retinopathy Accordingly, the present invention provides a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy, including treatment at the pre-diabetic retinopathy stage, the nonproliferative diabetic retinopathy stage, and the proliferative diabetic retinopathy stage. By "prophylactic" is meant the protection, in whole or in part, against diabetic retinopathy, in particular diabetic macular edema. By "therapeutic" is meant the amelioration of diabetic retinopathy, itself, and the protection, in whole or in part, against further diabetic retinopathy, in particular diabetic macular edema.

The method comprises the administration of an inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway in an amount sufficient to treat the retina for retinopathy prophylactically or therapeutically Any inhibitor of the branched chain amino acid-dependent aminotransferase pathway can be used in the method of the present

570
658
894

invention as long as it is safe and efficacious. Herein, "branch chain amino acid-dependent aminotransferase (BCAT) inhibitor" will be used to refer to such compounds and is intended to encompass all compounds that affect the branch chain amino acid-dependent aminotransferase pathway at any and all points in the pathway

Preferably, the BCAT inhibitor is a compound of Formulas I, II, and/or III, as described above, or a pharmaceutically acceptable, BCAT pathway-inhibiting analogue or prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt, ester, or amide of any of the foregoing.

Unless otherwise expressly stated, the following definitions are adhered to throughout this disclosure.

"Alkyl" means a straight or branched hydrocarbon radical having from 1 to 10 carbon atoms (unless stated otherwise) and includes, for example, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sec-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-pentyl, iso-pentyl, n-hexyl, and the like. "Halogen" includes fluoro, chloro, bromo, and iodo

"Alkenyl" means straight and branched hydrocarbon radicals having from 2 to 6 carbon atoms and one double bond and includes ethenyl, 3-buten-1-yl, 2-ethenylbutyl, 3-hexen-1-yl, and the like.

"Alkynyl" means straight and branched hydrocarbon radicals having from 2 to 6 carbon atoms and one triple bond and includes ethynyl, 3-butyn-1-yl, propynyl, 2-butyn-1-yl, 3-pentyn-1-yl, and the like.

"Cycloalkyl" means a monocyclic or polycyclic hydrocarbyl group such as cyclopropyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclodecyl, cyclobutyl, adamantyl, norpinanyl, decalinyl, norbornyl, cyclohexyl, and cyclopentyl. Such groups can be substituted with groups such as hydroxy, keto, and the like. Also included are rings in which 1 to 3 heteroatoms replace carbons Such groups are termed "heterocyclyl", which means a cycloalkyl group also bearing at least one heteroatom selected from O, S, or NR_2, examples being substituted or unsubstituted oxiranyl, pyrrolidinyl, piperidyl, tetrahydropyran, piperazinyl, acylpiperazinyl, pyrrolidinyl, and morpholine.

0017529 0110D

574 295
659

"Alkoxy" refers to the alkyl groups mentioned above bound through oxygen, examples of which include methoxy, ethoxy, isopropoxy, tert-butoxy, and the like. In addition, alkoxy refers to polyethers such as $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$, and the like.

"Alkanoyl" groups are alkyl linked through a carbonyl, ie, $C_1-C_5-C(O)-$ Such groups include formyl, acetyl, propionyl, butyryl, and isobutyryl.

"Acyl" means an alkyl or aryl (Ar) group bonded through a carbonyl group, ie, R-C(O)- For example, acyl includes a C_1-C_6 alkanoyl, including substituted alkanoyl, wherein the alkyl portion can be substituted by NR^4R^5 or a carboxylic or heterocyclic group. Typical acyl groups include acetyl, benzoyl, and the like.

The alkyl, alkenyl, alkoxy, and alkynyl groups described above are optionally substituted, preferably by 1 to 3 groups selected from NR^4R^5, phenyl, substituted phenyl, thio C_1-C_6 alkyl, C_1-C_6 alkoxy, hydroxy, carboxy, C_1-C_6 alkoxycarbonyl, halo, nitrile, cycloalkyl, and a 5- or 6-membered carbocyclic ring or heterocyclic ring having 1 or 2 heteroatoms selected from nitrogen, substituted nitrogen, oxygen, and sulfur "Substituted nitrogen" means nitrogen bearing C_1-C_6 alkyl or $(CH_2)_nPh$ where n is 1, 2, or 3 Perhalo and polyhalo substitution is also embraced.

Examples of substituted alkyl groups include 2-aminoethyl, pentachloroethyl, trifluoromethyl, 2-diethylaminoethyl, 2-dimethylaminopropyl, ethoxycarbonylmethyl, 3-phenylbutyl, methanylsulfanylmethyl, methoxymethyl, 3-hydroxypentyl, 2-carboxybutyl, 4-chlorobutyl, 3-cyclopropylpropyl, pentafluoroethyl, 3-morpholinopropyl, piperazinylmethyl, and 2-(4-methylpiperazinyl)ethyl.

Examples of substituted alkynyl groups include 2-methoxyethynyl, 2-ethylsulfanylethynyl, 4-(1-piperazinyl)-3-(butynyl), 3-phenyl-5-hexynyl, 3-diethylamino-3-butynyl, 4-chloro-3-butynyl, 4-cyclobutyl-4-hexenyl, and the like.

001752999 = 011100

577
660

Typical substituted alkoxy groups include aminomethoxy, trifluoromethoxy, 2-diethylaminoethoxy, 2-ethoxycarbonylethoxy, 3-hydroxypropoxy, 6-carboxhexyloxy, and the like.

Further, examples of substituted alkyl, alkenyl, and alkynyl groups include dimethylaminomethyl, carboxymethyl, 4-dimethylamino-3-buten-1-yl, 5-ethylmethylamino-3-pentyn-1-yl, 4-morpholinobutyl, 4-tetrahydropyrimidylbutyl, 3-imidazolidin-1-ylpropyl, 4-tetrahydrothiazol-3-yl-butyl, phenylmethyl, 3-chlorophenylmethyl, and the like.

The terms "Ar" and "aryl" refer to unsubstituted and substituted aromatic groups. Heteroaryl groups have from 4 to 9 ring atoms, from 1 to 4 of which are independently selected from the group consisting of O, S, and N Preferred heteroaryl groups have 1 or 2 heteroatoms in a 5- or 6-membered aromatic ring. Mono and bicyclic aromatic ring systems are included in the definition of aryl and heteroaryl. Typical aryl and heteroaryl groups include phenyl, 3-chlorophenyl, 2,6-dibromophenyl, pyridyl, 3-methylpyridyl, benzothienyl, 2,4,6-tribromophenyl, 4-ethylbenzothienyl, furanyl, 3,4-diethylfuranyl, naphthyl, 4,7-dichloronaphthyl, pyrrole, pyrazole, imidazole, thiazole, and the like.

Preferred Ar groups are phenyl and phenyl substituted by 1, 2, or 3 groups independently selected from the group consisting of alkyl, alkoxy, thio, thioalkyl, hydroxy, -$COOR^7$, amino of the formula -NR^4R^5, and $T(CH_2)_mQR^4$ or $T(CH_2)_mCO_2R^4$ wherein m is 1 to 6, T is O, S, NR^4, $N(O)R^4$, NR^4R^6Y, or CR^4R^5, Q is O, S, NR^5, $N(O)R^5$, or NR^5R^6Y wherein R^4 and R^5 are as described above, and R^7 is alkyl or substituted alkyl, for example, methyl, trichloroethyl, diphenylmethyl, and the like. The alkyl and alkoxy groups can be substituted as defined above. For example, typical groups are carboxyalkyl, alkoxycarbonylalkyl, hydroxyalkyl, hydroxyalkoxy, and alkoxyalkyl

The symbol "-" means a bond.

The term "patient" means all animals including humans. Examples of patients include humans, cows, dogs, cats, goats, sheep, and pigs.

0017539 9.011100

523-661

The compounds of the present invention can exist in unsolvated forms as well as solvated forms, including hydrated forms. In general, the solvated forms, including hydrated forms, are equivalent to unsolvated forms and are intended to be encompassed within the scope of the present invention

Certain of the compounds of the present invention possess one or more chiral centers and each center may exist in the R(D) or S(L) configuration. The present invention includes all enantiomeric and epimeric forms as well as the appropriate mixtures thereof.

The compounds of Formulas I, II, and III are capable of further forming both pharmaceutically acceptable formulations comprising salts, esters, amides, and prodrugs. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salts, esters, amides, and prodrugs" refers to those carboxylate salts, amino acid addition salts, esters, amides, and prodrugs of the compounds of the present invention which are, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of patients without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio, and effective for their intended use, as well as the zwitterionic forms, where possible, of the compounds of the invention. The term "salts" refers to the relatively non-toxic, inorganic and organic acid addition salts of compounds of the present invention. These salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the compounds or by separately reacting the purified compound in its free base form with a suitable organic or inorganic acid and isolating the salt thus formed and including, but not limited to, acid addition and/or base salts, solvents and N-oxides of a compound of Formulas I, II, and III. This invention also provides pharmaceutical formulations comprising a compound of Formulas I, II, or III together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient therefor All of these forms are within the present invention.

Pharmaceutically acceptable acid addition salts of the compounds of Formulas I, II and III include salts derived form inorganic acids such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydriodic,

5017539 99-011100

574
662
298

phosphorus, and the like, as well as the salts derived from organic acids, such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, alkanedioic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids, etc. Such salts thus include sulfate, pyrosulfate, bisulfate, sulfite, bisulfite, nitrate, phosphate, monohydrogenphosphate, dihydrogenphosphate, metaphosphate, pyrophosphate, chloride, bromide, iodide, acetate, propionate, caprylate, isobutyrate, oxalate, malonate, succinate, suberate, sebacate, fumarate, maleate, mandelate, benzoate, chlorobenzoate, methylbenzoate, dinitrobenzoate, phthalate, benzenesulfonate, toluenesulfonate, phenylacetate, citrate, lactate, maleate, tartrate, methanesulfonate, and the like. Also contemplated are the salts of amino acids such as arginate, gluconate, galacturonate, and the like; see, for example, Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," *J of Pharmaceutical Science*, 1977;66 1-19

The acid addition salts of the basic compounds are prepared by contacting the free base form with a sufficient amount of the desired acid to produce the salt in the conventional manner The free base form may be regenerated by contacting the salt form with a base and isolating the free base in the conventional manner The free base forms differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to their respective free base for purposes of the present invention.

Pharmaceutically acceptable base addition salts are formed with metals or amines, such as alkali and alkaline earth metal hydroxides, or of organic amines. Examples of metals used as cations are sodium, potassium, magnesium, calcium, and the like. Examples of suitable amines are N,N'-dibenzylethylenediamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, N-methylglucamine, and procaine; see, for example, Berge, et al., supra.

The base addition salts of acidic compounds are prepared by contacting the free acid form with a sufficient amount of the desired base to produce the salt in the conventional manner The free acid form may be

0017539 9 01110D

875
663

regenerated by contacting the salt form with an acid and isolating the free acid in a conventional manner The free acid forms differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties such as solubility in polar solvents, but otherwise the salts are equivalent to their respective free acid for purposes of the present invention.

Examples of pharmaceutically acceptable, non-toxic esters of the compounds of this invention include C_1-C_6alkyl esters wherein the alkyl group is a straight or branched chain. Acceptable esters also include C_5-C_7cycloalkyl esters as well as arylalkyl esters such as, but not limited to benzyl C_1-C_4alkyl esters are preferred. Esters of the compounds of the present invention may be prepared according to conventional methods.

Examples of pharmaceutically acceptable, non-toxic amides of the compounds of this invention include amides derived from ammonia, primary C_1-C_6alkyl amines and secondary C_1-C_6dialkyl amines wherein the alkyl groups are straight or branched chain. In the case of secondary amines the amine may also be in the form of a 5- or 6-membered heterocycle containing one nitrogen atom. Amides derived from ammonia, C_1-C_3alkyl primary amines, and C_1-C_2dialkyl secondary amines are preferred. Amides of the compounds of the invention may be prepared according to conventional methods.

The term "prodrug" refers to compounds that are rapidly transformed *in vivo* to yield the parent compound of the above Formulae, for example, by hydrolysis in blood A thorough discussion is provided in T Higuchi and V Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol 14 of the A.C.S Symposium Series, and in *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed Edward B Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, both of which are incorporated herein by reference. In general, a prodrug is a drug which has been chemically modified and may be biologically inactive at its site of action, but which may be degraded or modified by one or more enzymatic or other in vivo processes to the parent bioactive form

EP 0 175 599 A1

576
664

A therapeutically effective amount is an amount of a compound of Formulas I, II, or III, that when administered to a patient, ameliorates a symptom of the disease.

The BCAT inhibitor, which is preferably a compound of Formulas I, II, and/or III, a BCAT pathway-inhibiting analogue of Formulas I, II, and/or III, a BCAT pathway-inhibiting prodrug of Formulas I, II, and/or III, or a pharmaceutically acceptable salt of any of the foregoing, can be administered in accordance with the present inventive method by any suitable route. Suitable routes of administration include systemic, such as orally or by injection, topical, intraocular, periocular (e.g., subTenon's), subconjunctival, subretinal, suprachoroidal and retrobulbar. The manner in which the BCAT inhibitor is administered is dependent, in part, upon whether the treatment of retinopathy is prophylactic or therapeutic. The manner in which the BCAT inhibitor is administered for therapeutic treatment of retinopathy is dependent, in part, upon the cause of the retinopathy.

For example, given that diabetes is the leading cause of retinopathy, the BCAT inhibitor can be administered prophylactically as soon as the pre-diabetic retinopathy state is detected. For the prophylactic treatment of retinopathy that can result from diabetes, the BCAT inhibitor is preferably administered systemically, e.g., orally or by injection. For the therapeutic treatment of nonproliferative diabetic retinopathy, the BCAT inhibitor can be administered systemically, e.g., orally or by injection, or intraocularly. Proliferative diabetic retinopathy can be therapeutically treated by the administration of the BCAT inhibitor intraocularly, topically, subconjunctivally or periocularly (e.g., subTenon's), for example. The BCAT inhibitor is preferably administered intraocularly, topically, subconjunctivally or periocularly (e.g., subTenon's) for the prophylactic or therapeutic treatment of retinopathy before, during or after surgical removal from an eye of scar tissue generated during neovascularization during the proliferative diabetic stage.

The BCAT inhibitor is preferably administered as soon as possible after it has been determined that an animal, such as a mammal, specifically

SD1753599.01100

577
665

a human, is at risk for retinopathy (prophylactic treatment) or has begun to develop retinopathy (therapeutic treatment) Treatment will depend, in part, upon the particular BCAT inhibitor used, the amount of the BCAT inhibitor administered, the route of administration, and the cause and extent, if any, of retinopathy realized.

One skilled in the art will appreciate that suitable methods of administering a BCAT inhibitor, which is useful in the present inventive method, are available. Although more than one route can be used to administer a particular BCAT inhibitor, a particular route can provide a more immediate and more effective reaction than another route. Accordingly, the described routes of administration are merely exemplary and are in no way limiting.

The dose administered to an animal, particularly a human, in accordance with the present invention should be sufficient to effect the desired response in the animal over a reasonable time frame. One skilled in the art will recognize that dosage will depend upon a variety of factors, including the strength of the particular BCAT inhibitor employed, the age, species, condition or disease state, and body weight of the animal, as well as the amount of the retina about to be affected or actually affected by retinopathy The size of the dose also will be determined by the route, timing and frequency of administration as well as the existence, nature, and extent of any adverse side effects that might accompany the administration of a particular BCAT inhibitor and the desired physiological effect. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that various conditions or disease states, in particular, chronic conditions or disease states, may require prolonged treatment involving multiple administrations.

Suitable doses and dosage regimens can be determined by conventional range-finding techniques known to those of ordinary skill in the art. Generally, treatment is initiated with smaller dosages, which are less than the optimum dose of the compound. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. The present inventive method will typically

001753999.011100

-392
578
666

involve the administration of from about 1 mg/kg/day to about 100 mg/kg/day, preferably from about 15 mg/kg/day to about 50 mg/kg/day, if administered systemically Intraocular administration typically will involve the administration of from about 0 1 mg total to about 5 mg total, preferably from about 0 5 mg total to about I mg total. A preferred concentration for topical administration is 100 mu M.

Compositions for use in the present inventive method preferably comprise a pharmaceutically acceptable carrier and an amount of a BCAT inhibitor sufficient to treat retinopathy prophylactically or therapeutically The carrier can be any of those conventionally used and is limited only by chemico-physical considerations, such as solubility and lack of reactivity with the compound, and by the route of administration. It will be appreciated by one of ordinary skill in the art that, in addition to the following described pharmaceutical compositions, the BCAT inhibitor can be formulated as polymeric compositions, inclusion complexes, such as cyclodextrin inclusion complexes, liposomes, microspheres, microcapsules and the like (see, e.g., U S. Pat. Nos. *4,997,652*, *5,185,152* and *5,718,922*).

The BCAT inhibitor can be formulated as a pharmaceutically acceptable acid addition salt. Examples of pharmaceutically acceptable acid addition salts for use in the pharmaceutical composition include those derived from mineral acids, such as hydrochloric, hydrobromic, phosphoric, metaphosphoric, nitric and sulfuric acids, and organic acids, such as tartaric, acetic, citric, malic, lactic, fumaric, benzoic, glycolic, gluconic, succinic, and arylsulphonic, for example p-toluenesulphonic, acids.

The pharmaceutically acceptable excipients described herein, for example, vehicles, adjuvants, carriers or diluents, are well-known to those who are skilled in the art and are readily available to the public. It is preferred that the pharmaceutically acceptable carrier be one which is chemically inert to the BCAT inhibitor and one which has no detrimental side effects or toxicity under the conditions of use.

The choice of excipient will be determined in part by the particular BCAT inhibitor, as well as by the particular method used to administer the

DOTTO-66257199.01100

303
579
667

composition. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of the pharmaceutical composition of the present invention. The following formulations are merely exemplary and are in no way limiting.

Injectable formulations are among those that are preferred in accordance with the present inventive method. The requirements for effective pharmaceutically carriers for injectable compositions are well-known to those of ordinary skill in the art (see Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., Banker and Chalmers, eds , pages 238-250 (1982), and ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toussel, 4th ed., pages 622-630 (1986)). It is preferred that such injectable compositions be administered intramuscularly, intravenously, or intraperitoneally

Topical formulations are well-known to those of skill in the art. Such formulations are suitable in the context of the present invention for application to the skin. The use of patches, corneal shields (see, e.g., U S Pat. No. *5,185,152*), and ophthalmic solutions (see, e.g., U S. Pat. No *5,710,182*) and ointments, e.g., eye drops, is also within the skill in the art.

Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the compound dissolved in diluents, such as water, saline, or orange juice; (b) capsules, sachets, tablets, lozenges, and troches, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as solids or granules, (c) powders, (d) suspensions in an appropriate liquid, and (e) suitable emulsions. Liquid formulations may include diluents, such as water and alcohols, for example, ethanol, benzyl alcohol, and the polyethylene alcohols, either with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, suspending agent, or emulsifying agent. Capsule forms can be of the ordinary hard- or soft-shelled gelatin type containing, for example, surfactants, lubricants, and inert fillers, such as lactose, sucrose, calcium phosphate, and corn starch. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, corn starch, potato starch, alginic acid, microcrystalline cellulose, acacia, gelatin, guar gum, colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, talc, magnesium stearate, calcium stearate, zinc stearate, stearic acid, and other

60175399.01100

S00668

excipients, colorants, diluents, buffering agents, disintegrating agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, and pharmacologically compatible excipients. Lozenge forms can comprise the active ingredient in a flavor, usually sucrose and acacia or tragacanth, as well as pastilles comprising the active ingredient in an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia, emulsions, gels, and the like containing, in addition to the active ingredient, such excipients as are known in the art.

The effectiveness of an orally administered drug is dependent upon the drug's efficient transport across the mucosal epithelium and its stability in entero-hepatic circulation. Drugs that are effective after parenteral administration but less effective orally, or whose plasma half-life is considered too short, may be chemically modified into a prodrug form.

Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. The inhibitor can be administered in a physiologically acceptable diluent in a pharmaceutical carrier, such as a sterile liquid or mixture of liquids, including water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, an alcohol, such as ethanol, isopropanol, or hexadecyl alcohol, glycols, such as propylene glycol or polyethylene glycol, dimethylsulfoxide, glycerol ketals, such as 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol, ethers, such as poly(ethyleneglycol) 400, an oil, a fatty acid, a fatty acid ester or glyceride, or an acetylated fatty acid glyceride, with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, such as a soap or a detergent, suspending agent, such as pectin, carbomers, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or carboxymethylcellulose, or emulsifying agents and other pharmaceutical adjuvants. Oils, which can be used in parenteral formulations include petroleum, animal, vegetable, or synthetic oils. Specific examples of oils include peanut, soybean, sesame, cottonseed, corn, olive, petrolatum, and mineral.

WO 00/44409 PCT/US00/01753

584 669 305

Suitable fatty acids for use in parenteral formulations include oleic acid, stearic acid, and isostearic acid. Ethyl oleate and isopropyl myristate are examples of suitable fatty acid esters.

Suitable soaps for use in parenteral formulations include fatty alkali metals, ammonium, and triethanolamine salts, and suitable detergents include (a) cationic detergents such as, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, and alkyl pyridinium halides, (b) anionic detergents such as, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates, (c) nonionic detergents such as, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkanolamides, and polyoxyethylenepolypropylene copolymers, (d) amphoteric detergents such as, for example, alkyl-p-aminopropionates, and 2-alkyl-imidazoline quaternary ammonium salts, and (e) mixtures thereof.

The parenteral formulations will typically contain from about 0 5 to about 25% by weight of the active ingredient in solution. Preservatives and buffers may be used. In order to minimize or eliminate irritation at the site of injection, such compositions may contain one or more nonionic surfactants having a hydrophile-lipophile balance (HLB) of from about 12 to about 17

The quantity of surfactant in such formulations will typically range from about 5 to about 15% by weight. Suitable surfactants include polyethylene sorbitan fatty acid esters, such as sorbitan monooleate and the high molecular weight adducts of ethylene oxide with a hydrophobic base, formed by the condensation of propylene oxide with propylene glycol The parenteral formulations can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampules and vials, and can be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid excipient, for example, water, for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind previously described.

Such compositions can be formulated as intraocular formulations, sustained-release formulations or devices (see, e.g., U S Pat. No

0175399-011100

582 300
670

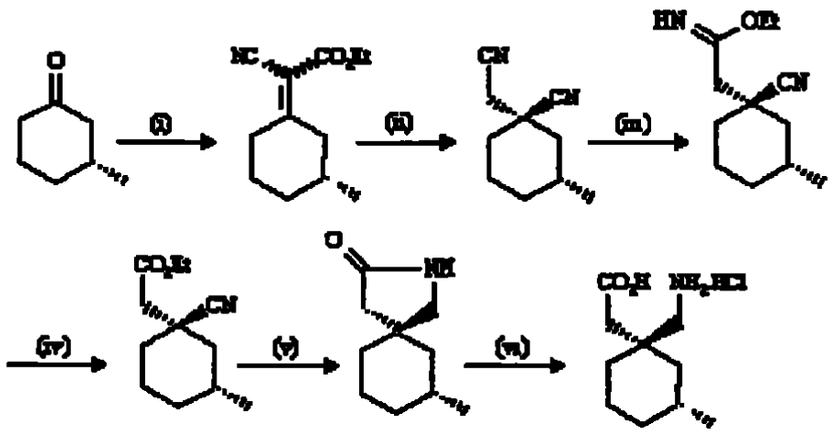
5,378,475). For example, gelantin, chondroitin sulfate, a polyphosphoester, such as bis-2-hydroxyethyl-terephthalate (BHET), or a polylactic-glycolic acid (in various proportions) can be used to formulate sustained-release formulations. Implants (see, e.g., U S Pat. Nos. *5,443,505*, *4,853,224* and *4,997,652*), devices (see, e g., U S Pat. Nos. *5,554,187*, *4,863,457*, *5,098,443* and *5,725,493*), such as an implantable device, e.g., a mechanical reservoir, an intraocular device or an extraocular device with an intraocular conduit (e.g., 100 mu -1 mm in diameter), or an implant or a device comprised of a polymeric composition as described above, can be used.

The present inventive method also can involve the co-administration of other pharmaceutically active compounds. By "co-administration" is meant administration before, concurrently with, e.g., in combination with the BCAT inhibitor in the same formulation or in separate formulations, or after administration of a BCAT inhibitor as described above. For example, corticosteroids, e.g., prednisone, methylprednisolone, dexamethasone, or triamcinalone acetinide, or noncorticosteroid anti-inflammatory compounds, such as ibuprofen or flubiprofen, can be co-administered Similarly, vitamins and minerals, e.g., zinc, anti-oxidants, e.g , carotenoids (such as a xanthophyll carotenoid like zeaxantinn or lutein), and micronutrients can be co-administered.

501753999 .011100

General synthetic schemes for preparing compounds of Formula I- IV

EXAMPLE 1 trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cycloheryl)-acetic acid hydrochloride



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Toluene, 120°C

(ii) a. NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115°C, b. HCl (g)

(iii) EtOH, HCl (g), Toluene

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2, EtOH/NH_3, Raney Ni, 20-30°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Step i. 2-Cyano-((R)-3-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester

A mixture of 3-(R)-Methylcyclohexanone (125mmol), Ethyl cyanoacetate (124mmol), Ammonium acetate (12.5mmol) and glacial Acetic acid (24mmol) were refluxed with a Dean Stark trap for 24 Hours. The mixture was cooled and washed with H_2O The H_2O washes were extracted with Toluene. The Toluene extracts were combined with the original organic layer, dried over $MgSO_4$ and the solvent evaporated. The crude oil was

589 672

purified by Kugelrohr distillation to give an oil. (Bpt oven temp 150-160°C). Yield 86%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1.01-1.05 (3H, m), 1.17-1.32 (1H, m), 1.35 (3H, t, J=7Hz), 1.42-2.30 (6H, m), 2.98 (1H, d, J=13Hz), 3.74 (1H, d, J=13Hz), 4.27 (2H, q, J=7Hz)

MS (CI) m/z 208 (MH^+)

Analysis $C_{12}H_{17}NO_2$ Calc: C 69.54 H 8.27 N 6.76,
Found: C 69.44 H 8.22 N 6.76

Step n. trans-(1R,3R)-1-Cyanomethyl-3-methyl-cyclohexanecarbonitrile

To a solution of NaCN (40mmol) in 6mL H_2O and 160mL Ethanol (95%) was added 2-Cyano-((R)-3-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (40mmol). After 22 Hours at reflux the cooled solution was filtered, the filtrate acidified with gaseous HCl and filtered again. The solvent was removed and the crude oil was purified by column chromatography to give a pale yellow crystalline solid. Yield 88%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0.90 (1H, m), 0.98 (3H, d, J=6Hz), 1.11 (1H, t, J=12Hz), 1.38 (1H, dt, J=4, 9Hz), 1.60-1.90 (4H, m), 2.07 (2H, m), 2.68 (2H, s)

MS (CI) m/z: 163 (MH^+)

Analysis $C_{10}H_{14}N_2$ Calc: C 74.04 H 8.70 N 17.27
Found. C 74.05 H 8.71 N 17.25

Step lll. trans-2-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester

To a solution of trans-(1R,3R)-1-Cyanomethyl-3-methyl-cyclohexanecarbonitrile (6.2mmol) in 30mL Ethanol (absolute) was added 30 mL dried Toluene. The solution was chilled in ice whilst saturating with gaseous HCl. The stoppered solution was then left to stand at room

0175999.01100

585
673

temperature for 24 Hours. The solvent was removed and the solid residue was triturated with Diethyl Ether to obtain a ppt which was dried to give a white crystalline solid. Yield 50%.

Mp 118-120°C

^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ. 0 8-0.89 (1H, m), 0 91 (3H, d, J=6.3Hz), 1 06-1 12 (1H, m), 1.24-1 35 (1H, m), 1 37 (3H, t, J=7Hz), 1 41-1 95 (6H, m), 3 02 (2H, s), 4 49 (2H, q, J=7Hz) MS (CI) m/z: 195 (MH^+)

Analysis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1 08M HCl Calc: C 58 19 H 8.58 N 11.31

Found. C 58.25 H 8 59 N 11 59

0175269 .0111100

Step iv· trans-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester

trans-2-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester (1 1mmol) was dissolved in ice cold H_2O (40mL) and the pH adjusted with 1N HCl to pH 1 5 The solution was stirred at room temperature for 20 Hours. Ethylacetate was added (30mL) and the organic layer was washed with H_2O, dried and the solvent removed to leave a clear oil. Yield 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0.78-0 90 (1H, m), 0.93 (3H, d, J=6Hz), 0.97-1 00 (1H, m), 1.23-1 25 (1H, m), 1 29 (3H, t, J=7 2Hz), 1.59-1 80 (4H, m), 2.05-2.08 (2H, Br t), 2.54 (2H, s), 4.20 (2H, q, J=7.2Hz)

MS (CI) m/z: 210 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{19}NO_2$ Calc: C 68 87 H 9 15 N 6.69

Found. C 68 87 H 9 11 N 6 90

Step v· trans-(5R,7R)-7-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one

586.674

trans-((1R,3R)-1-Cyano-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8.9mmol) was dissolved in NH_3/EtOH (7%, 40mL) along with prewashed Raney Nickel (H_2O followed by EtOH) in a 250mL Parr flask. The solution was hydrogenated at 30°C, 46psi for 24 Hours. The cooled solution was filtered through a pad of celite, washing with Ethyl acetate. The solvent was removed from the filtrate to leave a white solid. Yield 30%.

Mp 92-98°C

^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ 0.75-0.82 (1H, m), 0.84 (3H, d, J=6.4Hz), 0.88-0.94 (1H, m), 1.14-1.19 (1H, m), 1.20-1.50 (2H, m), 1.50-1.63 (4H, m), 1.91 (2H, s), 3.03 (2H, s), 7.42 (1H, s)

MS (CI) m/z: 168 (MH^+)

Analysis. $C_{10}H_{17}NO$	Calc:	C 71.81	H 10.25	N 8.37
	Found	C 71.80	H 10.29	N 8.31

Step vi: trans-((1R,3R)-1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride

trans-(5R,7R)-7-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one (2.17mmol) was dissolved in a solution of 10M HCl (5mL) and H_2O (5mL) and the mixture was refluxed at approx 140°C for 5 Hours. The cooled solution was diluted with 10 mL H_2O and 10 mL DCM and the aqueous layer was further washed with 2x15 mL DCM. The aqueous layer was then reduced to dryness to leave a white solid. Yield 76%.

Mp 148-155°C. $[\alpha]_D$ = -2.5 (T=20°C, c=1, MeOH). One isomer (RR).

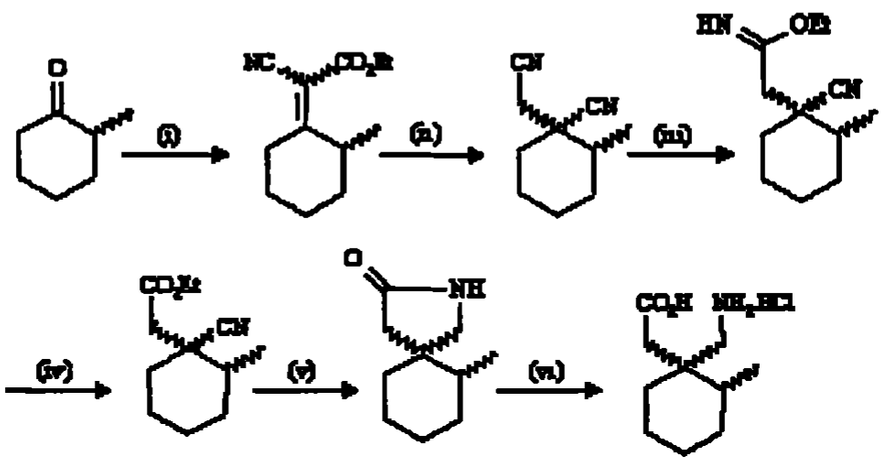
^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0.69-0.79 (1H, m), 0.82 (3H, d, J=6Hz), 0.87-0.90 (1H, m), 1.12-1.20 (1H, dt, J=4.5, 13.3Hz), 1.34-1.50 (3H, m), 1.60-1.63 (3H, m), 2.30 (2H, s), 3.01 (2H, s), 7.93 (3H, Br s)

MS (CI) m/z: 186 (MH^+)

WO 01/75399 PCT/US01/10109

Analysis	$C_{10}H_{19}NO_2$ 1 1 HCl	Calc.	C 53.29	H 8.99	N 6.21	
		Found	C 53 23	H 8.99	N 6.45	

EXAMPLE 2. (1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Toluene, 120°C

(ii) a. NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115°C, b HCl (g)

(iii) EtOH, HCl (g), Toluene

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2 EtOH/NH_3 RaneyNi, 30-50°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Step i. 2-Cyano-(2-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester

(+/-) 2-Methyl cyclohexanone (80mmol), Ethyl cyanoacetate (80mmol), Ammonium acetate (8mmol) and glacial Acetic acid (16mmol) were reacted as in the General method (Example 1) step i to give a clear oil. Yield 76%.

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1.23 (3H, dd, J=7, 10Hz), 1 35 (3H, t, J=7Hz), 1 55-1 82 (5H, m), 1 93-2.05 (1H, m), 2.17 (1H, dt, J=5, 14Hz), 2 47 (1H, dt, J=5, 9Hz), 2.92-2.97 (1H, Br d, J=15Hz), 3 30-3 35 (1H, m), 3 81-3 86 (1H, Br d, J=15 Hz), 4 06-4.14 (1H, m), 4 23-4.30 (3H, dq, J=1, 6Hz)

MS (CI) m/z: 208 (MH^+)

Analysis	$C_{12}H_{17}NO_2$	Calc:	C 69 54	H 8 27	N 6.76
		Found	C 69 26	H 8 26	N 6 66

Step ii. 1-Cyanomethyl-2-methyl-cyclohexanecarbonitrile

2-Cyano-(2-methyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (37mmol), NaCN (37mmol) were reacted as in the General method (Example 1) step ii. The crude solid was purified by column chromatography (3 1, Heptane Ethylacetate), to give a clear oil Yield 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1 06 (3H, d, J=6 8Hz), 1 11 (3H, d, J=6 8Hz), 1.20-2.20 (18H, m), 2.77 (2H, dd, J=16 8Hz), 2 63 (2H, dd, J=16 8Hz)

MS (CI) m/z: 163 (MH^+)

Analysis.	$C_{10}H_{14}N_2$ 0 1 H_2O	Calc:	C 73 49	H 8.69	N 16 86
		Found.	C 73.24	H 8.73	N 17 08

Step iii: 2-(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester

6017539 -011100

342
589
677

1-Cyanomethyl-2-methyl-cyclohexanecarbonitrile(7.3mmol) was reacted as in the General method (Example 1) Step (iii) to give a white solid. Yield 70%.

Mpt 107-114°C.

^{1}HNMR (DMSO) 400MHz δ· 1 00-1 06 (3H, 2xt, J=6.4Hz), 1 10-1.38 (2H, m), 1 38 (3H, t, J=6.8Hz), 1 40-2.10 (7H, m), 2.86, 2.92, 3 10, 3.28 (2H, 4xd, J=14,14 4, 14 8, 14Hz resp.), 4 48 (2H, q, J=6.8Hz)

MS (CI) m/z 209 (MH^+)

Analysis. $C_{12}H_{20}N_2O$ 1 06 HCl Calc: C 58 37 H 8.60 N 11.34

Found C 58 15 H 8.63 N 11 60

Step iv· (1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester

2-(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetimidic acid ethyl ester (4 1mmol) was reacted as in the General method (Example 1) step (iv) to give a clear oil. Yield 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 1 03, 1 09 (3H, 2xd, J=7Hz), 1.27-1 30 (3H, m), 1.32-2.00 (8H, m) 2.10-2.20 (1H, m), 2.44, 2.82 (3H, 2xd, J=14 8Hz), 2.54 (1H, m), 4 16-4.22 (2H, m)

MS (CI) m/z 210 (MH^+)

Analysis $C_{12}H_{19}NO_2$ Calc. C 68 87 H 9 15 N 6.69

Found. C 68.84 H 9 13 N 6.75

Step v· 6-Methyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one

(1-Cyano-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8 4mmol) was reacted as in the General method (Example 1) Step (v) for 24 Hours at 10°C,

GOTTTO' 66E5Z80Z

50 psi. The crude oil was purified by column chromatography (Ethylacetate), to give a white solid. Yield 34%

Mp 85-90 °C

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400MHz δ 0.88-0 91 (3H, dd, J=4, 6 8Hz), 1 41-1 78 (9H, m), 2.00-2.30 (2H, m), 3 06-3.23 (2H, m), 7 27 (1H, Br s)

MS (CI) m/z: 168 (MH^+)

Analysis $C_{10}H_{17}NO$ Calc C 71 81 H 10.24 N 8 37

Found. C 71 83 H 10 19 N 8.27

Step vi (1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride

6-Methyl-2-aza-spiro[4 5]decan-3-one (2.5mmol) was reacted as in the General method (Example 1) step vi to give a white solid. Yield 42%.

Mp: 108-110° C.

$[\alpha]_D$ = 0 (T=20 5° C, C=1, MeOH). Two Diastereomers 3 1

^{1}HNMR (DMSO + D_2O) 400MHz δ 0.79, 0.85 (3H, 2xd, J=6.8Hz), 1.21-1 65 (9H, m), 2.22, 2.43 (1H, 2xd, J=15Hz), 2.46, 2.49 (1H, 2xd, J=15Hz), 2.83-2.92 (1H, 2xd, J=13 6Hz), 3 05, 3 15 (1H, 2xd, J=13 6Hz).

MS (CI) m/z: 186 (MH^+)

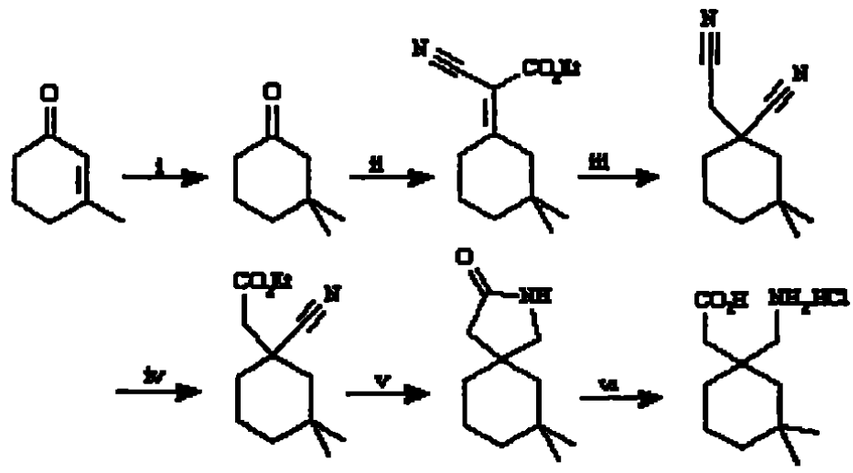
Analysis: $C_{10}H_{19}NO_2$ 1.3 HCl Calc. C 51.64 H 8.79 N 6.02

Found C 51 66 H 8.91 N 6 16

EXAMPLE 3 (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride (PD0167560-0002)

EP01753099.0111DD

SY 679



i) CuI, MeLi, NH_4Cl, NH_3, (329%)
ii) $NCCH_2CO_2Et$, NH_4OAc, AcOH, toluene, (83%)
iii) NaCN, EtOH, H_2O, (57%)
iv) HCl, EtOH, toluene, (28%)
v) H_2, Raney Ni, EtOH, NH_3, (94%)
vi) HCl, H_2O, (44%)

Step i: 3,3-Dimethyl-cyclohexanone:

Synthesised via the method outlined by Pelletier, S W , Mody, N V., *J. Org. Chem.*, 1976, 41, 1069

A solution of lithium dimethyl cuprate was prepared by the addition of methyl lithium (1 4M in ether, 77.25mL, 2.45mol) to copper (I) iodide (8.8g, 0.046mol) under argon. The solution was cooled to 0°C, and 3-methyl-cyclohexen-1-one (5mL, 0 044mol) was added dropwise, with stirring, and a deep yellow precipitate was formed. The suspension was stirred at room temperature for one hour before being poured into a solution of aqueous ammonia (100mL) and ammonium acetate (ca. 5g). The layers were separated and the aqueous layer washed with diethyl ether (3x 50mL). The combined organics were washed with saturated brine (3x 100mL), dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo to leave a dark yellow liquid.

WO 01/14300 PCT/GB00/03399

SER 680

^{1}H NMR (400MHz. $CDCl_3$) 0 98 (6H, s), 1 59 (2H, m), 1 88 (2H, m), 2.14 (2H, m), 2.26 (2H, m)

IR (film) ν_{max}cm ^{1} 2956, 1711 (C=O), 1457, 1368, 1292, 1226, 1076

Step ii: 2-Cyano-5,5-dimethyl-3-propyl-hex-2-enoic acid ethyl ester

To a solution of 3,3-dimethylcyclohexanone (4g, 0 032mol) in toluene (25mL) was added ethyl cyanoacetate (3 37mL, 0 032mol, 1 eq), ammonium acetate (0.24g, 0 003mol, 0 1eq.), and acetic acid (0.36mL, 0 006mol, 0 2eq) The yellow solution was heated to reflux whilst attached to a Dean-Stark trap, and heating was continued until no more water condensed in the trap. After cooling, the now orange solution was washed with water (3x 25mL) and the organic layer dried ($MgSO_4$) Filtration and removal of the solvent *in vacuo* gave the crude product as a deep orange liquid. Purification was achieved by Kugelrohr distillation to leave the mixture of *cis* and *trans* products as a pale yellow liquid, bp 160-170°C, 4 mbar (5 83g, 83%).

^{1}H NMR (400MHz. $CDCl_3$) 0.96 (6H, s, 2x Me), 0 99 (6H, s, 2x Me),1 34 (6H, m, 2x Me of ester), 1 49 (4H, m), 1 75 (2H, qun, *J* 6.4), 1 82 (2H, qun, *J* 6.4), 2.46 (2H, s), 2.60 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 2.80 (2H, s), 2.93 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 4.27 (4H, m).

MS (CI) z/e 222 (M^++1)

IR (film) ν_{max}cm ^{1} 2958, 2870, 2224 (CN), 1731 (C=O), 1606 (C=C), 1277, 1223

Analysis. $C_{13}H_{19}O_2N$ Calc: C 70 56 H 8 65 N 6.32
Found. C 70 35 H 8.79 N 6 25

Step iii: 1-Cyanomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile

GB0117539.0 06/05/99

S93 681
347

To a solution of the 2-Cyano-5,5-dimethyl-3-propyl-hex-2-enoic acid ethyl ester (1.26g, 0 006mol) in ethanol (100ml) and water (4mL) was added sodium cyanide (0 28g, 0 006mol, 1 eq). The yellowish solution was heated to reflux for 8 hours and then cooled, during which time an off-white precipitate was formed.

The suspension was filtered under vacuum and the filtrate acidified with HCl gas until the pH was approximately 2 The mixture was then filtered a second time and then the solvent removed *in vacuo* to leave the crude product as a pale green solid.

Flash column chromatography after adsorption of the crude product on to silica, eluting with 0-50% EtOAc in heptane gave the buntrile as a colourless solid (0 57g, 57%).

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0 99 (3H, s, Me), 1 13 (1H, td, *J* 13 2, 4.2), 1.21 (3H, s, Me), 1.32 (2H, m), 1 54 (1H, m), 1 82 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.65 (2H, s, CH_2CN).

^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 19.61, 25 17, 30 79, 31 18, 33 77, 34 79, 35 37, 37 92, 46.26, 115 06, 122.19

MS (CI) z/e 177 (M^++1)

IR (film) ν_{max} cm^{-1} 2988, 2937, 2869, 2237 (2x CN), 1749, 1456, 1423, 1369, 1202, 1180, 1031, 972.

Analysis. $C_{11}H_{16}N_2$ Calc: C 74 96 H 9 15 N 15 89
Found. C 75 08 H 9 32 N 15 80

Step iv" (1-Cyano-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester"

1-Cyanomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (0 50g, 2.84mmol) was dissolved in absolute ethanol (20mL) at room temperature and then cooled to 0^0C. Toluene (20mL) was added to the solution and then the reaction mixture was acidified by passing HCl gas through it at a gentle rate for *ca.* 45 mins The flask was then stoppered and left to stand at room temperature for 24 hours.

001775399 "011100

594
682
258

The yellow solution was partitioned between ethyl acetate and water and the layers separated. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3x 30mL), and the combined organics washed with aq sat. sodium hydrogen carbonate solution (3x 50mL), brine (3x 50mL), dried ($MgSO_4$), and the solvent removed under reduced pressure to leave a pale yellow liquid (0 59g, 93%)

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0 94 (3H, s, Me), 1 16 (3H,m), 1 21 (3H, s, Me), 1 29 (3H, t, *J* 7.2, CH_2CH_3), 1 50 (1H, m), 1 65 (1H, dt, *J* 14 4, 7 6), 1 84 (1H, qt, *J* 13.3, 3.2),1 96 (1H, dt, *J* 13 7, 2.2), 2.16 (1H, m), 2.48, (1H, d, *J* 15 6, C-2H), 2.54 (1H, d, *J* 15 6, C-2H), 4 20 (2H, q, *J* 7.2, CH_2CH_3).
^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 14.21, 19 65, 25 42, 31 03, 34 04, 34 14, 36.08, 38 44, 46.14, 46.80, 61 02, 123 67, 169 00
MS (CI) z/e 224 (M^++1).
IR (film) ν_{max}cm^{-1} 2998, 2937, 2868, 2234 (CN), 1738 (C=O), 1457, 1372, 1217, 1181, 1154, 1026.

Analysis. $C_{13}H_{21}NO_2$	Calc:	C 69 92	H 9 48	N 6.27
	Found	C 69 63	H 9 45	N 6.15

Step v 7,7-Dimethyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one:

(1-Cyano-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (0 5g, 2.23mmol) was hydrogenated in ethanolic ammonia (60mL) with Raney nickel as catalyst (ca. 0.25g) at 50°C and 50psi for 48 hours.
The catalyst was then removed by filtration through Celite, and the solvent removed *in vacuo* to leave a greenish crystalline solid.
Flash column chromatography, eluting with 0-100% ethyl acetate in heptane, gave the pure lactam as a colourless solid (340 mg, 84%).

^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 0.89 (3H, s, Me), 0.92 (3H, s, Me), 1.25 (2H, m), 1 36 (2H, m), 1 51 (3H, m), 1 68 (1H, s), 2.18 (1H, d, *J* 16.4, CH_2NH), 2.24 (1H, d, *J* 16 8, CH_2NH), 3 15 (2H, s, CH_2CO).

WO 01/11100 PCT/GB00/03139

595 683 339

^{13}C NMR (400MHz, $CDCl_3$) 19 16, 29 88, 30 36, 31.28, 36 57, 39 05, 39 61, 44 58, 49 54, 54 79, 177 72.

MS (CI) z/e 182 (M^++1).

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 3203, 3100 (NH), 2914, 2860, 1698 (C=O), 1486, 1374, 1317, 1289, 1257, 1076.

Analysis. $C_{11}H_{19}NO$	Calc:	C 72.88	H 10 56 N 7 73
	Found	C 72 38	H 10 47 N 7 56

Step vi (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride:

7,7-Dimethyl-2-aza-spiro[4 5]decan-3-one (0 3g, 1.66mmol) was dissolved in a mixture of HCl (conc., 5mL) and water (5mL), and the resultant colourless solution heated to reflux for 20 hours. The solution was cooled and then partitioned between water and dichloromethane, and the layers separated. The aqueous layer was washed with dichloromethane (3x 20mL) and the water/HCl removed by rotary evaporation to leave the crude product as an off-white solid. Trituration of this solid with ethyl acetate and filtration of the product gave (1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt as a colourless solid (140mg, 42%, 64% based on recovered starting material).

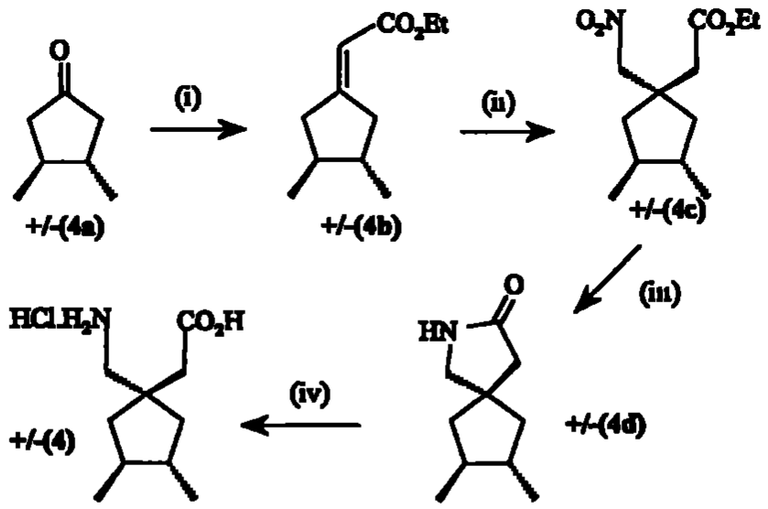
^{1}H NMR (400MHz, DMSO) 0 90 (3H, s, Me), 0 92 (3H, s, Me), 1 15-1 49 (8H, m), 2.45 (2H, s, CH_2CO_2H), 2.90 (2H, br q, J 13 5, CH_2NH_3), 7 96 (3H, br s, NH_3), 12.36 (1H, br s, OH).

IR (film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 2930, 1728 (C=O), 1272, 1123

Analysis $C_{11}H_{22}NO_2Cl$	Calc:	C 56.04	H 9 41 N 5 94
	Found	C 55 79	H 9 61 N 6.23

EXAMPLE 4. (±)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride

EP01753399.0111DO



Reagents. (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$,$Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Step i: synthesis of (±) (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (4b)

NaH (60% dispersion in oil, 737 mg, 18 42 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (50 mL) and cooled to 0°C. Triethylphosphonoacetate (3 83 mL, 19 30 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. The ketone (+/-)-(4a) (1 965 g, 17 54 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL) The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 3 01 g (94%) of (4b) as a colorless oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 01 (3H, d, J = 6 Hz), 1 03 (3H, d, J = 6 Hz), 1.26 (3H, t, J = 7 Hz), 1 49 (2H, m), 2 07 (1H, m), 2.24 (1H, m), 2.61 (1H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 72 (1H, s).

MS (CI+) m/e: 183 (M+1)

SAT 685 327

Step ii. synthesis of (±)(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (4c)

(±)(trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (4b) (2 95 g, 16.2 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (10 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (1 9 mL, 35 2 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 0 M in tetrahydrofuran, 22 mL, 22 0 mmol) After 6 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL), and washed with 2N HCl (30 mL) followed by brine (50 mL) The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 1 152 g (29%) of a clear oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1 10-1 39 (5H, m), 1 47 (2H, m), 1 87 (1H, m), 2 03 (1H, m), 2.57 (2H, ABq, J = 16, 38 Hz), 4 14 (2H, q, J = 7 Hz), 4 61 (2H, ABq, J = 12, 60 Hz)
MS (ES+) m/e: 244 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Step iii. Synthesis of (±)-(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4.4]nonan-2-one (4d)

(±)(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (4c) (1 14 g, 4 7 mmol) was dissolved in methanol (50 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C After 5 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo to give 746 mg (95%) of a pale yellow oil which solidified on standing.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1 32 (2H, m), 1 46 (2H, m), 1 97 (2H, m), 2.27 (2H, ABq, J = 16, 27 Hz), 3 23 (2H, s), 5 62 (1H, br s)

5017539 9 .011100

S97-686

MS (ES+) m/e: 168 (M+1).

IR (film) ν cm^{-1} 1451, 1681, 1715, 2948, 3196

Step iv: Synthesis of (±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (4)

(±)-(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4.4]nonan-2-one (4d) (734 mg, 4.40 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL). After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 x 30 mL). The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo. The residue was triturated with ethyl acetate to give 675 mg (69%) of a white solid after collection and drying.

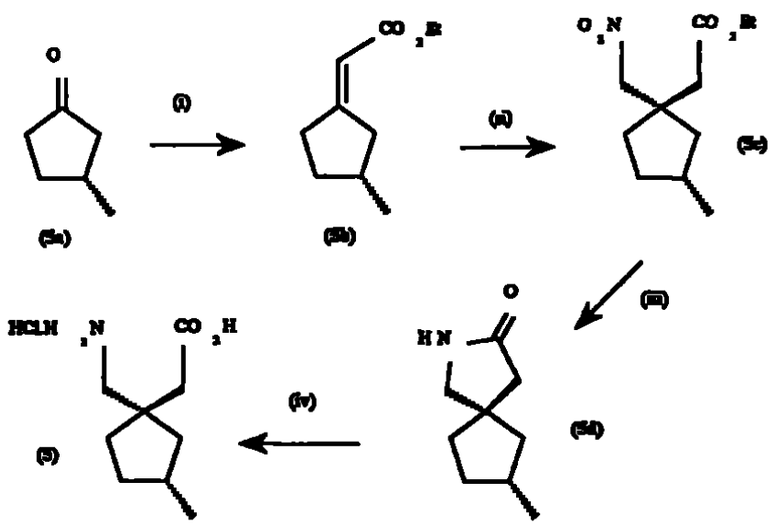
^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0.91 (6H, d, J = 6 Hz), 1.18 (2H, m), 1.42 (2H, m), 1.72 (1H, m), 1.87 (1H, m), 2.42 (2H, ABq, J = 16, 24Hz), 2.90 (2H, ABq, J = 12, 34 Hz), 8.00 (3H, br s), 12.34 (1H, br s)

MS (ES+) m/e. 186 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 5 (cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (5)

02/25/99 08:11:00

5994 687 2920



Reagents. (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$; (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Step i. Synthesis of (R)-(3-Methyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (5b)

NaH (60% dispersion in oil, 1 86 g, 46.5 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (40 mL) and cooled to 0°C. Triethylphosphonoacetate (9 69 mL, 48.8 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. (R)-3-Methyl-cyclopentanone (5a) (5 ml, 46 5 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL) The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 5 45 g (70%) of (2) as a colorless oil

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 04 (3H, m), 1.27 (3H, t, J = 7 Hz), 1 80-2.74 (7H, m), 2.90-3 15 (1H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 76 (1H, s)
MS (CI+) m/e: 169 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1205, 1371, 1653, 1716, 2955

Step ii: Synthesis of (cis/trans)-(3R)-(3-Methyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (5c)

(R)-(3-Methyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (5b) (3 0 g, 17 8 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (1 92 mL, 35 6 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 0 M in tetrahydrofuran, 25 mL, 25 0 mmol) After 18 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL), and washed with 2N HCl (30 mL) followed by brine (50 mL) The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 9) to give 2 00 g (49%) of a clear oil.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$)· δ 1 02 (3H, d, J = 6 Hz), 1 08-1 37 (5H, m), 1 59-2.17 (5H, m), 2 64 (2H, m), 4 15 (2H, q, J = 7 Hz), 4 64 (2H, m)
MS (ES+) m/e: 230 (M+1).
IR (film) ν cm^{-1} 1183, 1377, 1548, 1732, 2956.

Step iii:Synthesis of (cis/trans)-(7R)-7-Methyl-spiro[4.4]nonan-2-one (5d)

(cis/trans)-(3R)-(3-Methyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (5c) (1 98 g, 8 66 mmol) was dissolved in methanol (50 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C. After 18 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo and the residue purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 1 1) to give 1 05 g (79%) of a white solid.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$)· δ 1 03 (3H, m), 1 22 (2H, m), 1 60-2.15 (5H, m), 2 22 (2H, m), 3 20 and 3.27 (2H total, 2 × s, cis, and trans), 6 18 (1H, br s)
MS (ES+) m/e: 154 (M+1)
IR (film) ν cm^{-1} 1695, 2949, 3231

00775399 .0111100

601 689 325

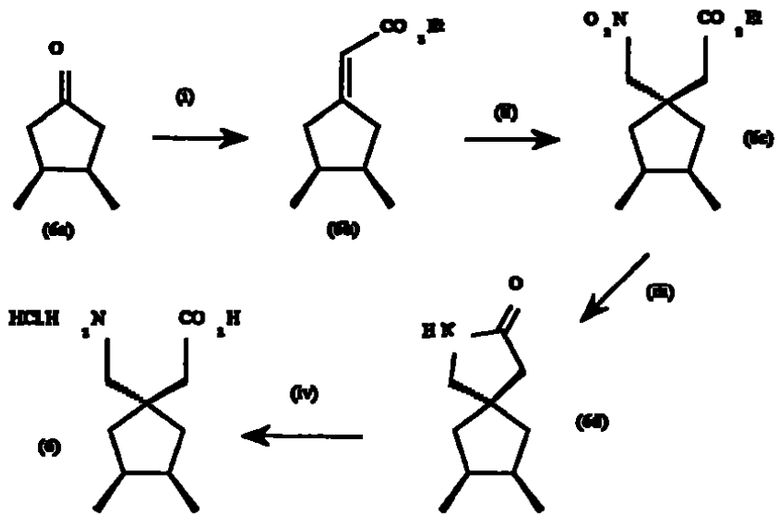
Step iv: Synthesis of (cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (5)

(cis/trans)-(7R)-7-Methyl-spiro[4.4]nonan-2-one (5d) (746 mg, 4.88 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL). After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 x 30 mL). The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo. The residue was triturated with ethyl acetate to give a white solid which was collected and dried. This was recrystallized from ethyl acetate/methanol to give 656 mg (65%) of (5) after collection and drying.

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO): δ 0.96 (3H, m), 1.01-1.24 (2H, m), 1.42-2.10 (5H, m), 2.41 and 2.44 (2H total, 2 x s, cis/trans), 2.94 (2H, m), 7.96 (3H, br s), 12.35 (1H, br s).

MS (ES+) m/e: 172 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 6 (+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride



Reagents: (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

5011559999.011100

Step i. Synthesis of (cis)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (6b)

NaH (60% dispersion in oil, 519 mg, 12 96 mmol) was suspended in dry tetrahydrofuran (30 mL) and cooled to 0°C Triethylphosphonoacetate (2.68 mL, 13 5 mmol) was added and the mixture stirred at 0°C for 15 minutes. (3S,4R)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (6a) (1 21 g, 10 80 mmol) in THF (10 mL) was then added and the mixture allowed to warm to room temperature. After 2 hours, the mixture was partitioned between diethyl ether (200 mL) and water (150 mL) The organic phase was separated, washed with brine, dried ($MgSO_4$) and the solvent removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 5 95) to give 1 40 g (71%) of (2) as a colorless oil.

^{1}H NMR 400 MHz (CDCl 3) δ 0 84 (3H, d, J = 6 Hz), 0 91 (3H, d, J = 6 Hz), 1 26 (3H, t, J = 7 Hz), 2.01-2.95 (6H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 76 (1H, s).
MS (CI+) m/e: 183 (M+1).
IR (film) ν cm^{-1} 1043, 1125, 1200, 1658, 1715, 2959

Step ii. Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (6c)

(cis)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (6b) (1 384 g, 7 60 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (10 mL) and stirred at 70°C with nitromethane (0 82 mL, 15 2 mmol) and tetrabutylammonium fluoride (1 0M in tetrahydrofuran, 11 4 mL, 11 4 mmol) After 6 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate (50 mL) and washed with 2N HCl (30 mL) fbllowed by brine (50 mL) The organic phase was collected, dried ($MgSO_4$), and the solvent removed in vacuo The residue was purified by flash chromatography (silica, ethyl acetate:heptane 5 95) to give 0 837 g (45%) of a clear oil.

601753299 011100

603
691
327

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 91 (6H, d, J = 6 Hz), 1 21-1 39 (5H, m), 1 98 (2H, m), 2 18 (2H, m), 2 64 (2H, s), 4 15 (2H, q, J = 7 Hz), 4 61 (2H, s)

MS (ES+) m/e: 244 (M+1)

IR (film) ν cm^{-1} 1184, 1377, 1548, 1732, 2961

Step iii: Synthesis of (trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4.4]nonan-2-one (6d)

(trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (6c) (0 83 g, 3 4 mmol) was dissolved in methanol (30 mL) and shaken over Raney nickel catalyst under an atmosphere of hydrogen (40 psi) at 30°C After 4 hours, the catalyst was removed by filtration through celite. The solvent was removed in vacuo to give 567 mg (99%) of a pale yellow oil which solidified on standing.

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 89 (6H, d, J = 6 Hz), 1 38 (2H, m), 1 91 (2H, m), 2 10 (2H, m), 2 32 (2H,s), 3 18 (2H, s), 5 61 (1H, br s)

MS (ES+) m/e: 168 (M+1)

IR (film) ν cm^{-1} 1304, 1450, 1699, 2871, 3186

Step iv- Synthesis of (trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (6)

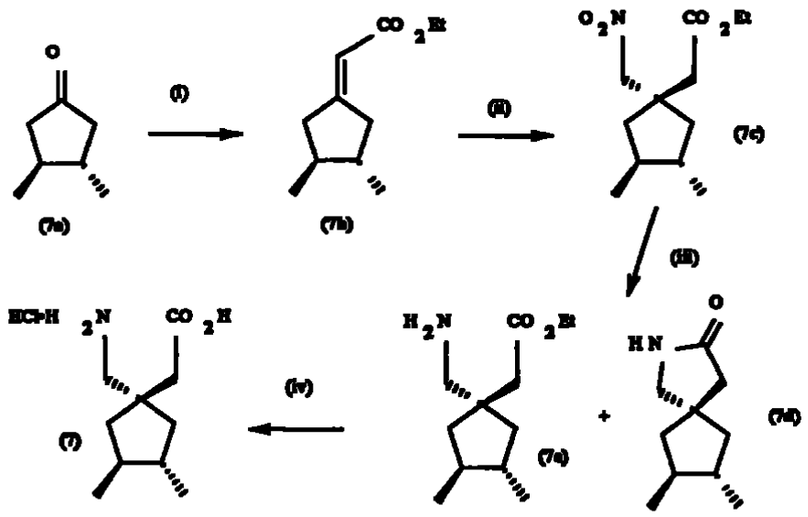
(trans)-7,8-Dimethyl-spiro[4 4]nonan-2-one (6d) (563 mg, 4 40 mmol) was heated to reflux in a mixture of 1,4-dioxan (5 mL) and 6N HCl (15 mL) After 4 hours, the mixture was cooled to room temperature, diluted with water (20 mL), and washed with dichloromethane (3 × 30 mL) The aqueous phase was collected and the solvent removed in vacuo The residue was triturated with ethyl acetate to give a white solid which was collected and dried. This was recrystallized from ethyl acetate/methanol to give 440 mg (59%) of (6) after collection and drying.

6017539 "66E5"

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 84 (6H, d, J = 6 Hz), 1 21 (2H, m), 1 81 (2H, m), 2.06 (2H, m), 2.47 (2H, s), 2 89 (2H, s), 7 94 (3H, br s), 12 30 (1H, br s).

MS (ES+) m/e 186 (M+1 for the free base)

EXAMPLE 7 (+)-(trans)-(1-Ammomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride



Reagents (i) Triethylphosphonoacetate, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$; (iii) H_2, Ni, (iv) Hcl.

(3S,4S)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (7a) is known in the literature and can be synthesized by the methods outlined therein. Y Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 1966,14 1438-1439 and related references. W C. M. C Kokke, F A. Varkevisser, *J Org. Chem.*, 1974;39 1535, R. Baker, D C. Billington, N Eranayake, *JCS Chem. Comm*, 1981 1234, K. Furuta, K. Iwanaga, H. Yamamoto, *Tet. Lett.*, 1986;27 4507, G Solladie, O Lohse, *Tet. Asymm*, 1993,4 1547, A. Rosenquist, I. Kvarnstrom, S C. T Svensson, B Classon, B Samuelsson, *Acta Chem.*

Scand, 1992,46 1127, E. J Corey, W Su, *Tet Lett*, 1988,29 3423, D W Knight, B Ojhara, *Tet. Lett*, 1981,22 5101

Step i. Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (7b)

To a suspension of sodium hydride (1 3 g, 32.5 mmol) in THF (60 mL) under nitrogen at 0°C was added triethylphosphonoacetate (6 5 mL, 32.7 mmol) over 5 minutes. After stirring for a further 10 minutes, a solution of (3S,4S)-3,4-Dimethyl-cyclopentanone (7a) (approx. 2.68 g, approx. 30 mmol) in THF (2 x 10 mL) was added to the now clear solution and the ice bath removed. After 4 hours the reaction was quenched by pouring into water (100 mL) and the mixture extracted with ether (400 mL) The organic phase was washed with saturated brine (100 mL), dried and concentrated in vacuo Column chromatography (10 1 heptane/ethyl acetate) gave the product as an oil (4 53 g). (approx. 91% yield)

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1 01 (3H, d, J = 6 Hz), 1 03 (3H, d, J = 6 Hz), 1.26 (3H, t, J = 7 Hz), 1 49 (2H, m), 2.07 (1H, m), 2.24 (1H, m), 2 61 (1H, m), 4 13 (2H, q, J = 7 Hz), 5 72 (1H, s).

MS (CI+) m/e: 183 (M+1)

Step ii. Synthesis of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (7c)

To a solution of (trans)-(3,4-Dimethyl-cyclopentylidene)-acetic acid ethyl ester (7b) (4.24 g, 23 3 mmol) in THF (15 mL) was added TBAF (32 mL of a 1 M solution in THF, 32 mmol) followed by nitromethane (3 mL) and the reaction heated at 60°C for 8 hours. After cooling, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate (150 mL) and washed with 2N HCl (40 mL) then saturated brine (50 mL). Column chromatography (10 1 heptane/ethyl acetate) gave the product as an oil (2.24 g). (40% yield)

0017539 9.011100

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 0 98 (6H, d, J = 6 Hz), 1 10-1 39 (5H, m), 1 47 (2H, m), 1 87 (1H, m), 2.03 (1H, m), 2 57 (2H, ABq, J = 16, 38 Hz), 4 14 (2H, q, J = 7 Hz), 4 61 (2H, ABq, J = 12, 60 Hz)

MS (ES+) m/e 244 (M+1)

IR (film) ν cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Step iii. Synthesis of (+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride (7)

A solution of (trans)-(3,4-Dimethyl-1-nitromethyl-cyclopentyl)-acetic acid ethyl ester (7c) (3 5 g, 14 4 mmol) in methanol (100 mL) in the presence of Ni sponge was hydrogenated at 30°C and 50 psi for 4 hours. Filtering off the catalyst and concentrating in vacuo gave a 2 1 mixture of lactam and aminoester, 2.53 g, calculated as 96%, which was used without purification. This mixture (2.53 g, 13 8 mmol) in dioxane (15 mL) and 6N HCl (45 mL) was heated under reflux (oil bath = 110°C) for 4 hours. After cooling and diluting with water (60 mL), the mixture was washed with dichloromethane (3 × 50 mL) and then concentrated in vacuo The resulting oil was washed with ethyl acetate then dichloromethane to give a sticky foam which was dried to give the product as a white powder (2.32 g). (76% yield)

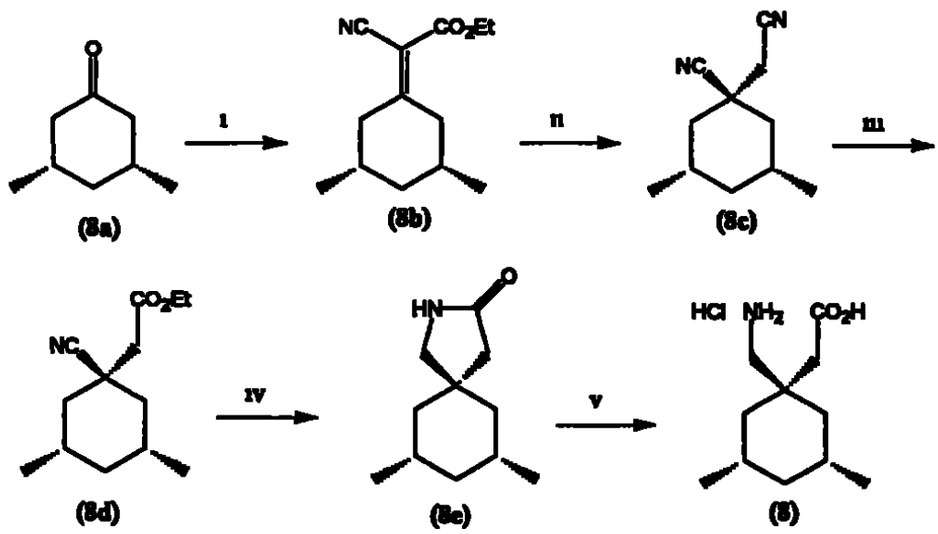
α_D (23°C) (H_2O) (c = 1 002) = +28.2°

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0 91 (6H, d, J = 6 Hz), 1 18 (2H, m), 1 42 (2H, m), 1 72 (1H, m), 1 87 (1H, m), 2.42 (2H, ABq, J = 16, 24 Hz), 2 90 (2H, ABq, J = 12, 34 Hz), 8 00 (3H, br s), 12 34 (1H, br s)

MS (ES+) m/e 186 (M+1 for the free base).

0017539 "011100

EXAMPLE 8 **1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride**



Step 1. Synthesis of 2-Cyano-((3R,5S)-3,5-dimethyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (8b) Cis-3,5-dimethylcyclohexanone (8a, 15 78 g, 125 0 mmol) was dissolved in toluene (150 mL), and treated with ammonium acetate (0 96 g, 0 099 mmol), acetic acid (1 4 mL, 0 195 mmol), and ethyl cyanoacetate (14 04 g, 99.2 mmol) The reaction was heated to reflux overnight with a Dean-Stark trap, then cooled to room temperature and washed with H_2O (3 x 50 mL) The aqueous layer was backwashed with toluene (2 x 50 mL) The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4, and concentrated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with 5 % EtOAc/hexane to give 22 0 g (80%) of the desired product as a clear oil

MS 222.1 (M+1 for $C_{13}H_{19}N_1O_2$); an oil, TLC SiO_2, R_f 0 40 (9 1 hexane/EtOAc),

Analysis ($C_{19}H_{19}N_1O_2$) (Cal) C 70 56, H 8 68, N 6 33 (found) C 70 74, H 8 68, N 6 33 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 83-0 95 (m, 1 H), 1 01 (t, 6 H, J = 6 1 Hz), 1 32 (t, 3 H, J = 7.3 Hz), 1 48-1 85 (m, 5 H), 2 97-3 02 (m, 1 H), 3 92 (dd, 1 H, J = 12.2, 2 2 Hz), 4 24 (q, 2 H, J = 7 1 Hz)

Step ii. Synthesis of 1α,3β,5β-1-Cyanomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (8c) The 2-Cyano-((3R,5S)-3,5-dimethyl-cyclohexylidene)-acetic acid ethyl ester (8b, 6 64 g, 30 0 mmol) was dissolved in EtOH (60 mL) and added to a suspension of NaCN (1 47 g, 30 0 mmol) in EtOH / H_2O (100 mL / 8 mL). The reaction was heated to reflux overnight, then cooled to room temperature, filtered, and concentrated in vacuo to give a clear oil which solidified under vacuum. The residue was chromatographed on silica gel eluting with 4 1 hexane/EtOAc to give 4 05 g (77%) of the desired product as a white, sticky solid.

MS no M+1 ion observed ($C_{11}H_{16}N_2$); an oil, TLC SiO_2, R_f 0.31 (4 1 hexane/EtOAc),
Analysis ($C_{11}H_{16}N_2$) (Cal.) C 74 96, H. 9 15, N 15 89 (found) C. 74 81, H. 9.25, N 15 65 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 58 (dd, 1 H, J = 24 9, 12.2 Hz), 0 96 (d, 6 H, J = 6.6 Hz), 1 03 (t, 2 H, J = 12.9 Hz), 1 75-1 90 (m, 3 H), 2 01 (d, 2 H, J = 11 5 Hz), 2.65 (s, 2 H).

Step iii. Synthesis of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride (PD0178554-0002) (8d): 1α,3β,5β-1-Cyanomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexanecarbonitrile (8c, 5 51 g, 31 26 mmol) was dissolved in EtOH (80 mL) and toluene (80 mL), cooled to 0 °C, and saturated with HCl gas. The solution was stoppered and stirred overnight at room temperature, then concentrated in vacuo to give the crude imino ester as a white solid. This crude material was

501753969-011100

triturated with Et_2O (150 mL) and dried under vacuum, then treated with H_2O (100 mL) and 1 N HCl (4 mL) The reaction was stirred overnight at room temperature, then extracted with EtOAc (3 x 100 mL) The organic layers were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4, and concentrated. The residue was chromatographed on silica gel eluting with 6 1 hexane/EtOAc to give 5 78 g (83%) of the desired product as a clear oil.

MS 224 1 (M+1 for $C_{13}H_{21}N_1O_2$); an oil, TLC SiO_2, R_f 0 32 (6 1 hexane/EtOAc),
Analysis ($C_{13}H_{21}N_1O_2$) (Cal.) C 69 92, H. 9 48, N 6.27 (found) C: 70 03, H. 9 45, N 6 30 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 9, 12.0 Hz), 0 91 (d, 6 H, J = 6.6 Hz), 1 27 (t, 3 H, J = 7 1 Hz), 1 70-1 76 (m, 1 H), 1 80-1 90 (m, 2 H), 2.02 (d, 2 H, J = 12.9 Hz), 2.51 (s, 2 H), 4 18 (q, 2 H, J = 7 1 Hz).

Step iv: Synthesis of 5α,7β,9β-7,9-Dimethyl-2-aza-spiro[4.5]decan-3-one (8e) 1α,3β,5β-(1-Cyano-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid ethyl ester (8d, 5 82 g, 26 1 mmol) was dissolved in MeOH (150 mL), treated with 10% Rh / 2% Pd/C (1 0 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 28 h. The reaction was filtered and concentrated in vacuo The residue was chromatographed on silica gel eluting with a gradient of 2.3 hexane/EtOAc, EtOAc, 5% MeOH/EtOAc to give 2.21 g (47%) of the desired product.

MS 182.0 (M+1 for $C_{11}H_{19}N_1O_1$), mp 116-118 °C, TLC SiO_2, R_f 0 36 (6% MeOH/CH_2Cl_2), Analysis ($C_{11}H_{19}N_1O_1$) (Cal.) C. 72.88, H 10 56, N 7 73 (found) C 72 84, H. 10 67, N 7 63 ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0 49 (dd, 1 H, J = 24 4, 12 0 Hz), 0 86-0 93 (m, 8 H), 1 38-1 48 (m, 2 H), 1 60-1 71 (m, 3 H), 2.09 (s, 2 H), 3 16 (s, 2 H), 5 79 (br, 1 H)

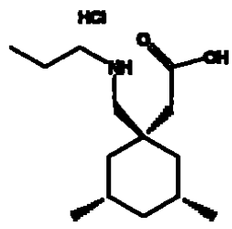
EDITED 99/753799

GD 698

Step v: Synthesis of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8): 5α,7β,9β-7,9-Dimethyl-2-aza-spiro[4 5]decan-3-one (8e, 0 52 g, 2.87 mmol) was treated with 6 N HCl (19 mL) and heated to reflux overnight The reaction was cooled to room temperature, upon which a white precipitate formed. The solid was filtered away, and the filtrate was cooled to 0 °C to afford a second crop of crystals, then filtered again. The solids were combined and dried under vacuum to give 0 46 g (68%) of the desired product.

MS 200 1 (M+1 for $C_{11}H_{21}N_1O_2$); mp 179-180 °C; Analysis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 56 04, H. 9 41, N 5 94 (found) C 56 16, H. 9 42, N 5 73 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 46-0 53 (m, 1 H), 0 77 (t, 1 H, J = 12 5 Hz), 0 85-0 91 (m, 7 H), 1 55-1 67 (m, 5 H), 2.11 (d, 2 H, J = 13 4 Hz), 2.36 (s, 2 H), 2.44 (s, 1 H), 3 14 (s, 2 H).

EXAMPLE 9 1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt:



1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8, 1 0 g, 4 2 mmol) was dissolved in EtOH (100 mL), treated with sodium hydroxide solution (1 N, 5 mL), propionaldehyde (0.9 mL, 12 6 mmol), and 10 % Pd/C (0 3 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 3 h. The reaction was filtered, treated with HCl/Et_2O (1

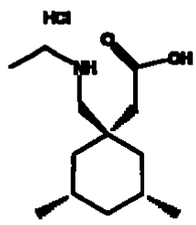
EP 0 752 399 A1

GH 699

M, 10 mL), and concentrated in vacuo The residue was treated with hot isopropanol (100 mL), the NaCl was filtered away, and the clear solution was concentrated in vacuo The crude product was recrystallized from i-PrOH/acetone/hexane (14 200 225 mL) and dried under vacuum to give 0 136 g (12%) of the desired product.

MS 242 1 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$), mp 178-180 °C; Analysis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$ HCl 0 27 H_2O) (Cal) C 59 48, H 10 18, N 4 95 (found) C 59 53, H. 10 21, N 4 78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 52 (dd, 1 H, J = 24 2, 12.0 Hz), 0 83-0 90 (m, 8 H), 1 00 (t, 3 H, J = 7 6 Hz), 1 61-1 80 (m, 7 H), 2 43 (s, 2 H), 2 98 (t, 2 H, J = 7 8 Hz), 3 20 (s, 2 H).

EXAMPLE 10 1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt

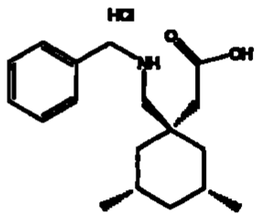


Example 10 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except that acetaldehyde was used instead of propionaldehyde and ethyl acetate/heptane was used for the recrystallization (30% yield)

MS 228 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$), mp 188-190 °C, ^{1}H NMR (DMSO) δ 0 83 (8H, br d), 1 24 (3 H, t, J = 7 1 Hz), 1 60 (6 H, m), 2.38 (d, s), 2.98 (2 H, m), 3 10 (2 H, br s), 8 33 (2 H, br s), 12.42 (1 H, br s)

00111D0 '66ES7ZS0

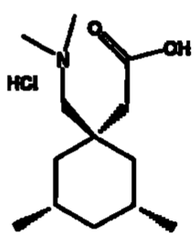
EXAMPLE 11 1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt:



Example 11 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except that benzaldehyde was used instead of propionaldehyde and Et_2O was used for the recrystallization (30% yield).

MS 290 1 (M+1 for $C_{18}H_{27}N_1O_2$), mp 162-163 °C, Analysis ($C_{18}H_{27}N_1O_2$.HCl 0 20H_2O) (Cal.) C 65 62, H 8 69, N 4 25 (found) C. 65 60, H. 8 71, N 4 31 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 48 (dd, 1 H, J = 12.5 Hz), 0 79-0.90 (m, 8 H), 1 46 (br, 2 H), 1 64 (d, 3 H, J = 13 4 Hz), 2 42 (s, 2 H), 3 19 (s, 2 H), 4 23 (s, 2 H), 7 43-7 50 (m, 5 H).

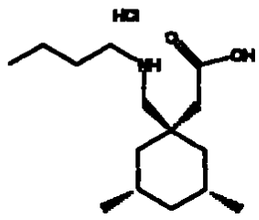
EXAMPLE 12 1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt



A solution of 1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt (8, 0.20 g, 0 59 mmol) in EtOH (15 mL), sodium hydroxide solution (1 N, 0 59 mmol), and H_2O (1 mL) was treated with 20% Pd/C (50 mg) and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 15 hours. The reaction was filtered, treated with 1 N HCl/Et_2O (1 mL), and concentrated in vacuo The residue was dissolved in hot i-PrOH (4 mL), diluted with acetone (100 mL) and Et_2O (350 mL) and cooled to 0 °C. The solid was filtered and dried under vacuum to give 103 mg (70% yield) of the desired product.

MS 228 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$), mp 195-196 °C, Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$.HCL0 41H_2O) (Cal.) C 57 58, H 9 97, N 5 16 (found) C. 57 73, H. 9 71, N 4 91 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 56 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.0 Hz), 0 89-0 92 (m, 8 H), 1 59-1 75 (m, 8 H), 2.51 (s, 2 H), 2 95 (s, 6 H), 3 44 (s, 2 H).

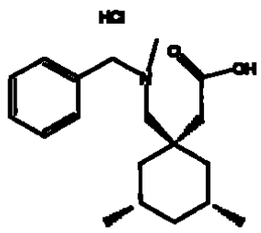
EXAMPLE 13 1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt:



Example 13 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except
butyraldehyde was used instead of propionaldehyde (48% yield)

MS 256 1 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$), mp 184-185 °C, Analysis ($C_{15}H_{29}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 61 73, H. 10.36, N 4 80 (found) C 61 71, H. 10.21, N 4 72 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.0 Hz), 0 86-0 99 (m, 11 H), 1 37-1 47 (m, 2 H), 1 60-1 75 (m, 7 H), 2.43 (s, 2 H), 3 02 (t, 2 H, J = 8.1 Hz), 3 20 (s, 2 H)

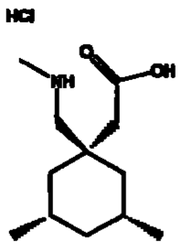
EXAMPLE 14 1α,3β,5β-[1-[(Benzyl-methyl-ammo)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid; hydrochloride salt:



Example 14 was prepared in accordance with the method of Example 9, except that the N-benzyl analog (11) and formaldehyde were used as the starting material and PtO_2 was used as the catalyst instead of Pd/C (70% yield)

MS 304 1 (M+1 for $C_{19}H_{29}N_1O_2$), mp 209-210 °C, Analysis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$.HCl.0.21H_2O) (Cal.) C. 66 40, H. 8 92, N 4 08 (found) C 66 40, H. 9 05, N 4 06 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 51 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.2 Hz), 0 79-0 92 (m, 9 H), 1 29 (br, 1 H), 1 56-1 82 (m, 4 H), 2.51 (dd, 2 H, J = 18.8, 16 3 Hz) 2.85 (s, 2 H), 3.23-3 49 (m, 2 H), 4.37 (dd, 2 H, J = 31 7, 12.7 Hz), 7 45-7 54 (m, 5 H)

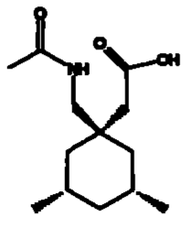
EXAMPLE 15 1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt.



Example 14 (0 14 g, 1 21 mmol) was dissolved in 95% EtOH (50 mL), treated with sodium hydroxide solution (1 N, 1 21 mmol) as well as 20% Pd/C (0 1 g), and shaken under an atmosphere of H_2 (50 psi) for 45 minutes. The reaction was filtered, treated with HCl/Et_2O (1 M, 1 mL), and concentrated in vacuo The residue was treated with hot iPrOH, the NaCl was filtered away, and the solution was concentrated in vacuo. The crude product was recrystallized from iPrOH/acetone/hexane (7 150 110 mL) and dried under vacuum to give 0 189 (63%) of the desired product.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$); mp 182-183 °C; Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C. 57 70, H. 9 68, N 5 61 (found) C 57 47, H. 9 58, N 5.35 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 52 (dd, 1 H, J = 24 4, 12.2 Hz), 0 84-0 98 (m, 8 H), 1 57-1 72 (m, 5 H), 2.38 (s, 2 H), 2.72 (s, 3 H), 3.21 (s, 2 H)

EXAMPLE 16 1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid

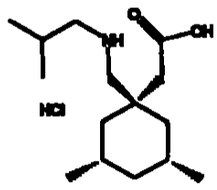


340
616
704

Example 8 (0 5 g, 2.1 mmol) was treated with H_2O (10 mL) and NaOH (0 56 g, 14 0 mmol), cooled to 0 °C, and treated with acetic anhydride. The reaction was stirred overnight at room temperature, then diluted with EtOAc (100 mL) and washed with 1 N HCl (100 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo The crude material was chromatographed on silica gel eluting with 4% MeOH/CH_2Cl_2 to give 0 138 g (27%) of the desired product as an oil which solidified under vacuum.

MS 242.1 (M+1 for $C_{15}H_{23}N_1O_3$), mp 122-124 °C, Analysis ($C_{15}H_{23}N_1O_3$) (Cal.) C 64 70, H. 9 61, N 5 80 (found) C 64 65, H. 9 59, N 5 63 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0 46 (dd, 1 H, J = 23 7, 11 7 Hz), 0 81-0 87 (m, 9 H), 1 56 (d, 2 H, J = 13 4 Hz), 1 65-1 76 (m, 3 H), 1 98 (s, 3 H), 2.18 (s, 2 H), 3 30 (s, 3 H).

EXAMPLE 17 1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt

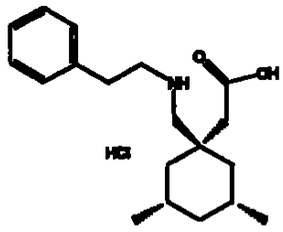


Example 17 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except isobutyraldehyde was used instead of propionaldehyde (53% yield).

5017559 .011100

MS 256 (M+1 for $C_{15}H_{29}N_1O_2$), mp 193-194 °C; ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 3, 12 5 Hz), 0 81-0 90 (m, 2 H), 0 89 (d, 6H, J = 6.4 Hz), 1 03 (d, 6H, J = 6 8 Hz), 1 57-1 71 (m, 5H), 2 09 (m, 1H), 2.49 (s, 2 H), 2.88 (d, 2H, J = 7 1 Hz), 3 19 (s, 2 H)

EXAMPLE 18 **1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:**



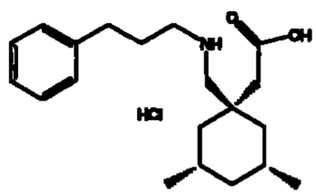
Example 18 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except
phenylacetaldehyde was used instead of propionaldehyde (16% yield)

MS 304 (M+1 for $C_{19}H_{29}N_1O_2$); mp 188-189 °C; Analysis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$.HCl) (Cal) C 67 14, H. 8.90, N 4 12 (found) C 66 94, H. 8 91, N 3 98 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 46 (dd, 1 H, J = 24 6, 12.3 Hz), 0 81-0 91 (m, 8 H), 1 58-1 72 (m, 5 H), 2.50 (s, 2H), 3 04-3 08 (m, 2H), 3 26-3 30 (m, 4H), 7 23-7 75 (m, 5H).

EXAMPLE 19 **1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:**

6017 344
705

5017523 99 .011100

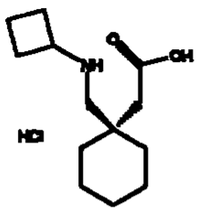


Example 19 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except

hydrocinnamaldehyde was used instead of propionaldehyde (50% yield)

MS 318 (M+1 for $C_{20}H_{31}N_1O_2$), mp 171-172 °C, Analysis ($C_{20}H_{31}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 67 87, H. 9 11, N 3 96 (found) C. 67 83, H. 9 13, N 3 78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 6, 12 1 Hz), 0 80-0 90 (m, 2 H), 0 90 (d, 6H, J = 6 0 Hz), 1 60-1 72 (m, 5 H), 2 03-2.11 (m, 2H), 2.45 (s, 2H), 2.73 (t, 2H, J = 7 5 Hz), 3 06 (t, 2H, J = 7 7 Hz), 3 3 (s, 2H), 7 20-7 18 (m, 5H).

EXAMPLE 20 {1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 20 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except

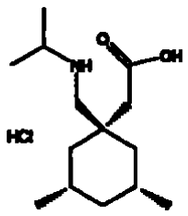
cyclobutanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (70% yield)

MS 226 (M+1 for $C_{13}H_{23}N_1O_2$), mp 176-177 °C, Analysis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C. 59 64, H. 9 24, N 5 35 (found) C 59 88, H.

614 343
707

9 18, N 5 19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 16-1 60 (br , 10 H), 1 80-1 96 (m, 2 H), 2.21-2.40 (m, 4 H), 2.53 (s, 2H), 2.97 (s, 2H), 3 73 (m, 1H).

EXAMPLE 21 1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 21 was synthesized in accordance with the method of Example 9, except
acetone was used instead of propionaldehyde (50% yield)

MS 242 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$); mp 206-207 °C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 53 (dd, 1 H, J = 24 8, 12 5 Hz), 0 80-0 90 (m, 2 H), 0 99 (d, 6H, J = 6 1 Hz), 1 35 (d, 6H, J = 6 6 Hz), 1.55-1 78 (m, 5H), 2.45 (s, 2H), 3 18 (s, 2 H), 3 41 (m, 1H)

EXAMPLE 22 1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 4087544, May 2, 1978

EXAMPLE 23 1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 4087544, May 2, 1978

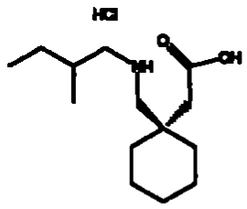
WO 01/75399 PCT/US01/11100

349
620
708

EXAMPLE 24 Sodium salt of 1-ammomethyl-1-cyclopentane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 4087544, May 2, 1978

EXAMPLE 25 Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid was previously reported in Satzinger et al. US 2960441, 1960

EXAMPLE 26 Synthesis of {1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt



A solution of (1-aminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid (Example 22, 2 0 g, 11 7 mmol) in EtOH (100 mL) was treated with 2-methyl-butyraldehyde (4 mL, 35 1 mmol) and PtO_2 (0 5 g), and shaken under at atmosphere of H_2 (50 psi) for 2 h The reaction was filtered, treated with 1 N HCl/Et_2O (12 mL), concentrated in vacuo, dissolved in hot i-PrOH (10 mL), diluted with acetone (600 mL), cooled to 0 °C, and filtered to give 1 58 g (49%) of the desired product.

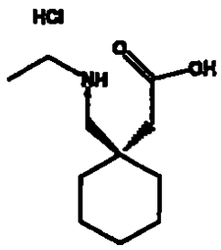
MS 242.1 (M+1 for $C_{14}H_{27}N_1O_2$); mp 162-163 °C, Analysis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C. 60 52, H. 10 16, N 5 04 (found) C 60 41, H. 10.26, N 4 95 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 95 (t, 3 H, J = 7.3 Hz), 1 02 (d, 3 H, J = 6 6 Hz), 1 20-1 31 (m, 1 H), 1 42-1 56 (m, 11 H), 1 81-1 89 (m, 1 H), 2.63 (dd, 2 H, J = 18 3, 16.1 Hz), 2 82 (dd, 1 H, J = 12 5, 8.3 Hz), 2.99 (12 5, 6 1 Hz), 3 07 (dd, 2 H, J = 25 6, 12.9 Hz)

501753969 011100

EXAMPLE 27 {1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that 4-trifluorobutyraldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (19% yield).

MS 282 1 (M+1 for $C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$), mp 163-164 °C, Analysis ($C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$.HCl.0 05H_2O) (Cal.) C 49 00, H. 7 31, N 4 40 (found) C 48 60, H. 7 29, N 4 19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 40-1 54 (m, 11 H), 1 96-2 04 (m, 2 H), 2.26-2.38 (m, 2 H), 2.57 (s, 2H), 3 09-3 13 (m, 4 H)

EXAMPLE 28 (1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt



Example 28 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that acetaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (30% yield).

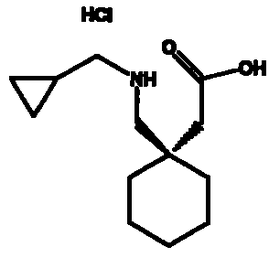
MS 200 1 (M+1 for $C_{11}H_{21}N_1O_2$), mp 160-166 °C; Analysis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$.HCl.) (Cal.) C. 56 04, H. 9 41, N 5 94 (found) C. 55 98, H. 9.36, N 5 79 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 31-1 54 (m, 13 H), 2 54-2.56 (m, 2 H), 3 06-3 13 (m, 4 H)

0017539 99 "0LLL00

346
622 710

5017539 - 011100

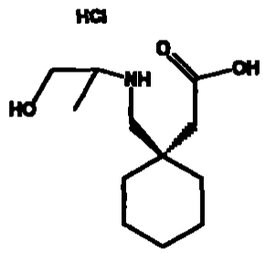
EXAMPLE 29 {1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 29 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclopropanecarboxaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (62% yield)

MS 226 (M+1 for $C_{13}H_{23}N_1O_2$); mp 177-178 °C, Analysis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 59 64, H. 9.24, N 5 35 (found) C. 59 72, H. 9 15, N 5.27 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 50-0 56 (m, 2 H), 0 71-0 74 (m, 2H), 1 05-1 30 (m, 1H), 1 42-1 54 (m, 10H), 2.52 (s, 2H), 2.94 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 3 10 (s, 2H).

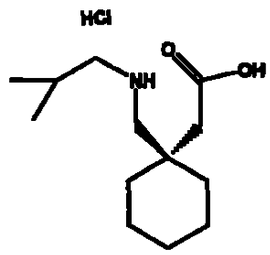
EXAMPLE 30 {1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt:



Example 30 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that 1-hydroxy-2-propanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (60% yield)

MS 230 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_3$), mp 164-165 °C, Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_3$.HCl) (Cal.) C 54 23, H 9 10, N 5 27 (found) C 54.23, H 9 01, N 5 18 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 30-1 32 (m, 3 H), 1 44-1 55 (m, 10H), 2.60 (s, 2H), 3 11 (m, 2H), 3 28 (br , 2H), 3 37 (br , 1H), 3 57-3 61 (m, 1H), 3 78-3 81 (m, 1H)

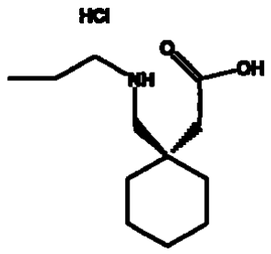
EXAMPLE 31 [1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 31 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclopropanecarboxaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde (35% yield)

MS 228 (M+1 for $C_{13}H_{25}N_1O_2$); mp 175-176 °C, Analysis ($C_{13}H_{25}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 59 19, H. 9 93, N 5 51, (found) C 59.28, H. 9 98, N 5 24 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 03 (d, 6H, J = 6 9 Hz), 1.37-1 60 (m, 10H), 2 10-2.17 (m, 1H), 2.63 (s, 2H), 2.87 (d, 2H, J = 7 4 Hz), 3 07 (s, 2H)

EXAMPLE 32 (1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt.

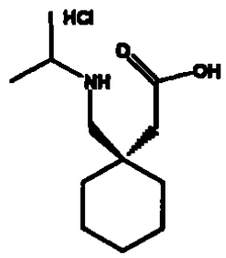


Example 32 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that propionaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$), mp 174-177 °C; Analysis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C 57 70, H. 9 69, N 5 61 (found) C. 57 55, H. 9 77, N 5 48 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0 93 (t, 1 H, J = 6.3 Hz), 0 99-1 03 (m, 4 H), 1 40-1 54 (m, 13 H), 1 72-1 78 (m, 2 H), 2.96-3.29 (m, 2 H).

EXAMPLE 33 [1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:

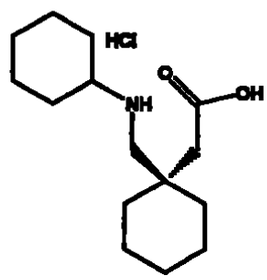
625 713 349



Example 33 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that acetone was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 214 1 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_2$), mp 193-194 °C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 29-1 57 (m, 18 H), 2.59 (s, 2 H), 3 07 (s, 2 H), 3 38-3 42 (m, 1 H)

EXAMPLE 34 (1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt:



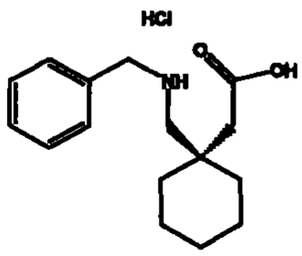
Example 34 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that cyclohexanone was used instead of 2-methylbutyraldehyde (48% yield)

MS 254 (M+1 for $C_{15}H_{27}N_1O_2$), mp 198-199 °C, Analysis ($C_{15}H_{27}N_1O_2$.HCl) (Cal.) C. 62.12, H 9 74, N 4 83 (found) C 62.18, H

6017539 .011100

9 84, N 4 75 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1 20-1 60 (m, 16 H), 1 63-1 76 (m, 1H), 1 88 (br , 2H), 2 13 (br , 2H), 2.60 (m., 2H), 3 09 (m., 3H).

EXAMPLE 35 [1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt:



Example 35 was synthesized in accordance with the method of Example 26, except that benzaldehyde was used instead of 2-methylbutyraldehyde.

MS 262.0 (M+1 for $C_{16}H_{23}N_1O_2$), mp 125-135 °C; ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.38-1 49 (m, 11 H), 2.55 (s, 2 H), 3 07 (s, 2 H), 4 23 (s, 2 H), 7 43-7 49 (m, 5 H).

EXAMPLE 36

Summary

Using an *ex vivo* model of freshly dissected rat retinas, the mechanisms by which brain glutamate levels are maintained within normal limits in neural tissue was investigated. Anaplerotic glutamate synthesis may be important to replenish glutamate oxidized in the glia following

001753'99 '011100

627
715

neurotransmission. Points of rate control through this *de novo* pathway were identified as pyruvate carboxylation and branched chain amino transamination. To test the relationship between glutamate synthesis and pyruvate carboxylase activity, synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ was measured as a function of medium pyruvate. Increasing pyruvate from 0 2 to 5 mM increased the ^{14}C-amino acid synthesis by 66 ± 15%. The specific radioactivity of glutamine relative to that of $H^{14}CO_3$ after 20 minutes of incubation indicated that ≈30% of glutamine in the retina is derived from bicarbonate fixation. To test the dependence of glutamate synthesis on availability of branched chain amino acids (BCAA) as a source of nitrogen, the effect of inhibiting the neuronal branched chain aminotransferase (BCATc) was measured Gabapentin (GBP) (1 mM), a selective inhibitor of BCATc in neurons, inhibited synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ by 31% without slowing $H^{14}CO_3$ incorporation into lactate and citric acid cycle intermediates. Inhibition of *de novo* glutamate synthesis was reversed by addition of 0 6 mM BCAA. The data indicated that pyruvate carboxylase and branched chain aminotransferase share rate control of *de novo* glutamate synthesis in the retina, and that *de novo* glutamate synthesis is quantitatively important for maintenance of retinal glutamate levels.

Methods

Experimental animals

Sprague Dawley rats (200-400g) were used for all experiments. Rats were housed under a 12 hour light/dark cycle, and fed and watered *ad libidum*

5017539 9 011100

After anaesthetizing the rats with-nembutal (IP), eyes were enucleated and retinas dissected in ice-cold buffer

CO_2 fixation

Freshly isolated half-retinas were preincubated at 37°C for 3 minutes in buffer A (pH 7 4) containing 118 mM NaCl, 4 7 mM KCl, 2 5 mM CaCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 1 17 mM $MgSO_4$, 20 mM HEPES, 5 mM glucose, 0 05 mM NH_4Cl and 25 mM $NaH^{14}CO_3$ Pyruvate (either 0.2 or 5mM) was also included in the buffer 1 ml buffer as well as the gas phase within 20 ml vials were equilibrated with 95% O_2, 5% CO_2 Incubations were initiated by addition of 10 µCi/ml $H^{14}CO_3$ The vessels were then immediately closed to the atmosphere. Most incubations continued for 20 minutes, although in some preliminary studies, times were varied from 10-60 minutes. Reactions were stopped by removing the half retinas from the buffer and placing them in 2% perchloric acid The buffer was separately acidified with perchloric acid (final concentration 2%) and unreacted $^{14}CO_2$ was allowed to diffuse out of the acidified samples.

The total amount of product (non-volatile carbon 14 metabolites) was determined by measuring the radioactivity in aliquots of the medium and tissue samples. Metabolites in the extracts were separated by Dowex-1 acetate chromatography as previously described Williamson, J R., and Corkey, B (1969) "Methods in Enzymology", Vol. 13, ed. Lowenstein, J.M. *(Academic Press)* pp 434-513, and quantified by scintillation counting. In most instances, individual metabolite carbon 14 data is reported as the sum of the radioactivity in the medium plus tissue extracts.

0017539 0110D

624
717
953

Complete quantification of ^{14}C-metabolite amounts in both the retina and in the medium can be found below in Tables I and II.

Data not shown in the results and discussion sections where collected in the course of carrying out the evaluation of the influences of pyruvate on $H^{14}CO_3$ fixation in the retina. Figure 2 shows only the effect of pyruvate on the sum glutamate plus glutamine and the sum pyruvate plus lactate. Table I provides values for all metabolites that became labeled with $H^{14}CO_3$ and their compartmentation.

Likewise additional data, not shown in the results and discussion sections, were collected in evaluating the influence of gabapentin. Thus Table II is an expansion of the data shown in Figure 4, and provides values for all metabolites labeled with $H^{14}CO_3$ and their compartmentation.

5017539 "011100

Table I

Condition	Compart-ment	Gln	Glu	Asp	Lact	TCA cycle	Total
Control (0.2 Pyr)	in	0.59 ± 0 05	1 47 ± 0 29	0 85 ± 0 06	0 16 ± 0 06	1 02 ± 0.26	4 08 ± 0 41
	out	0 61 ± 0 08	0 04 ± 0 01	0 08 ± 0 01	0 55 ± 0 03	0	1 19 ± 0 13
	sum	1.20 ± 0 09	1 51 ± 0 29	0 93 ± 0 08	0 71 ± 0 06	1 02 ± 0 26	5 27 ± 0 45
+5 0 Pyr	in	0 91 ± 0 13	2 67 ± 0.29	1 08 ± 0 12	0 29 ± 0 04	2 31 ± 0 13	7 26 ± 0 61
	out	0 96 ± 0 14	0 06 ± 0 01	0 08 ± 0 01	1 18 ± 0 11	0	2.24 ± 0 21
	sum	1 87 ± 0.23	2 73 ± 0.28	1 16 ± 0 12	1 47 ± 0 13	2.31 ± 0 13	9 50 ± 0 74

6380 718 354

Table II

Condition	Compart-ment	Gln	Glu	Asp	Lact	TCA cycle	Total
Control	in	0 440 ± 0 032	1 477 ± 0 097	0 634 ± 0 038	0 080 ± 0 008	1 096 ± 0 105	3 715 ± 0 266
	out	0 551 ± 0 036	0 008 ± 0 001	0 070 ± 0 003	0 478 ± 0 030	0	1 117 ± 0.075
	sum	0 991 ± 0 054	1 485 ± 0 096	0 704 ± 0 040	0 558 ± 0 031	1 096 ± 0 105	4 832 ± 0 303
+GBP	in	0.389 ± 0 026	1 324 ± 0 025	0 549 ± 0 019	0 089 ± 0 006	1 514 ± 0 103	3 902 ± 0 122
	out	0 545 ± 0 024	0 008 ± 0 002	0 035 ± 0 003	0 516 ± 0 030	0	1 066 ± 0 028
	sum	0 934 ± 0 036	1 332 ± 0 025	0 584 ± 0 022	0 605 ± 0 028	1 514 ± 0 103	4 968 ± 0 028
+GBP +BCAA	in	0 480 ± 0 011	1 549 ± 0 070	0 609 ± 0 021	0 086 ± 0 008	1 220 ± 0 116	3 989 ± 0 043
	out	0 806 ± 0 086	0 009 ± 0 001	0 093 ± 0 008	0 458 ± 0 048	0	1.322 ± 0 076
	sum	1.286 ± 0 082	1 558 ± 0 070	0 702 ± 0 016	0 5445 ± 0 040	1 220 ± 0 116	5 311 ± 0 119

00112100 '66E7S399

The chromatographic procedure employed in this example separates glutamine, glutamate, aspartate, and lactic acid. The citric acid cycle intermediates remain on the Dowex columns and are estimated as the difference between the total counts in the sample and the counts that are eluted. Evidence of the validity of this procedure has been reported previously Before subjecting samples to chromatography, ^{14}C-pyruvic acid in the samples was converted stoichiometrically to lactate by treating the samples with excess NADH and lactate dehydrogenase. Therefore the single lactate peak reported contains all carbon 14 in both lactate and pyruvate. To determine specific activity of glutamate and glutamine in the retinal samples, the mass amount of the glutamate was measured fluorometrically using a standard enzymatic procedure Patel, M S (1989) in Neuromethods. Carbohydrate and Energy Metabolism, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D *(The Humana Press, Inc.)* pp 309-340 The mass amount of glutamine was measured after chromatographic separation from glutamate followed by a luminometric determination previously described. ATP and creatine phosphate were measured fluorometrically using an enzymatic assay

631
719

Retinal protein was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) Each half retina contained about 0 4 mg protein.

Pyruvate Carboxylase Assay

Pyruvate carboxylase activity was assayed in fresh samples of whole brain and excised retinas. The method described by Patel Patel, M.S (1989) in *Neuromethods. Carbohydrate and Energy Metabolism*, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D (The Humana Press, Inc.) pp 309-340, was used and involves measuring $^{14}CO_2$ fixation under optimal conditions in sonicated tissue.

Western Blot

SDS-PAGE was performed as described Patel, M.S (1989) in *Neuromethods. Carbohydrate and Energy Metabolism*, Vol II, eds. Boulton, A.A and Baker G.D (The Humana Press, Inc.) pp 309-340, using 10% gels. For immunoblotting, protein were transferred to Immobilon P membranes. Membranes were blocked with 5% BSA and incubated with immunoaffinity purified rabbit anti-rat BCATc peptide antibody (1 1000 dilution) or immunoaffinity purified rabbit anti-human BCATm peptide antibody (1 1000 dilution). The immunoreactive protein bands were visualized using the ECL system according to manufacturer's instructions (Amersham, Arlington Heights, IL, USA).

Calculations and Statistics

Data are reported in text and figures by determining the dpm/mg in a particular metabolite and dividing by the specific activity of medium HCO_3 Therefore all data are reported as nmoles of $H^{14}CO_3$/mg protein for any given metabolite.

00110 '6617539

637 356
720

Results are reported as the mean ± standard error of the mean. Statistical significance was judged by paired t-test and a $p<0.05$. Numbers of independent determinations (n) are provided in figure and table legends.

Results

Pyruvate carboxylase levels are similar in retina and whole brain

Patel demonstrated that pyruvate carboxylase is the major CO_2 fixing enzyme in the adult rodent brain. To judge whether this might also be true in the retina, the activity of pyruvate carboxylase at 37°C in sonicates from neocortex was compared with those from the retina. The neocortex levels (2.9 ± 0.1 nmoles $H^{14}CO_3$ fixed/min/mg) were similar to those found in sonicated retinal tissues (3.4 ± 0.4 nmoles $H^{14}CO_3$ fixed/min/mg), indicating that pyruvate carboxylase was just as active in retina as whole brain.

Rates of both $^{14}CO_2$ fixation and ^{14}C-glutamate appearance are a function of pyruvate levels in the retina

In preliminary experiments retinas were incubated with 0.2 mM pyruvate as described in methods for 10, 20, 40 and 60 minute periods. Total $^{14}CO_2$ was monitored as well as ATP and creatine phosphate levels. ATP and creatine phosphate levels remained constant as a function of time, demonstrating that oxygenation and pH control were adequate throughout. Total CO_2 fixation (5.50 ± 0.14 nmoles/mg protein) peaked between 20 and 40 minutes, but was already 76% of maximal (4.2 ± 0.1 nmoles/mg) at 10 minutes. Since ATP (20 ± 0.2 nmoles/mg) and creatine

0017539 "011100

354
633
721

phosphate (16 ± 1 1 nmoles/mg) levels were high and did not change with time, this peak indicated that the rate of CO_2 fixation was constant, but that continuous breakdown of non-volatile carbon 14 products to $CO_2 + H_2O$ produced a near steady state level of glutamate and glutamine specific radioactivity by 20 minutes.

To assess the control of pyruvate carboxylation over glutamate synthesis, retinas were incubated with either 0.2 or 5 mM pyruvate in the medium and intracellular and extracellular metabolites analyzed. The total $^{14}CO_2$ fixed in 20 minutes in the presence of 0.2 mM pyruvate was 5.27 ± 0 45 nmoles $H^{14}CO_3$/mg, whereas that fixed in the presence of 5 mM pyruvate was 9 50 ± 0 74 nmoles $H^{14}CO_3$/mg. Figure 2 shows that increasing unlabelled pyruvate from 0.2 to 5 mM increases the sum ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine (from 1 74 ± 0 19 to2 90 ± 0.31 nmoles/mg, $p<0$ 005) Figure 2 also shows that the higher pyruvate incubation increases the ^{14}C-lactate plus ^{14}C-pyruvate values. Thus, at steady state, an increase in pyruvate concentration from 0 2 to 5 mM increased incorporation of $H^{14}CO_3$ into glutamate and glutamine by 66% whereas the increase in pyruvate increased $H^{14}CO_3$ incorporation into pyruvate and lactate by 111%. The carbon 14 cycled into pyruvate and lactate represents glial recycling through pyruvate carboxylase, malic enzyme and phosphoenolpyruvate carboxykinase and for the first time demonstrates active citric acid cycle decarboxylation in intact neural tissue.

5017599 .011100

634 722

These data show that an increase in flux through pyruvate carboxylase induces an increase in *de novo* synthesis of retinal glutamate. A somewhat larger increase in pyruvate recycling occurs simultaneously

A large fraction of total glutamine synthesis is derived from pyruvate carboxylation

The importance of pyruvate carboxylation as a source for replenishing the glutamate released from retinal nerve endings during neuronal transmission was assessed by determining the specific radioactivity of glutamine in retinal tissue incubated with medium containing $H^{14}CO_3$. A fixed proportion of glutamine synthesis in retina derives from unlabelled glutamate released by neurons and taken up by Müller glia. The remainder comes from glial α-ketoglutarate synthesized anaplerotically from pyruvate and $^{14}CO_2$. Therefore, the specific radioactivity of glutamine relative to the specific activity of $H^{14}CO_3$ provides a minimal value for the proportion of glutamine derived from anaplerosis. The product of pyruvate carboxylase in the glia is [1,4-^{14}C]-oxaloacetate. Both the 1 and 4 positions are labelled because the carbon 14 initially incorporated into the 4-C position of oxaloacetate is randomized between the 1 and 4 positions by equilibration of oxalacetate with symmetrical fumarate. The labelled oxaloacetate condenses with pyruvate to form citrate, which is then isomerized to isocitrate. [1,4-^{14}C]-isocitrate is oxidized and decarboxylated to [5-^{14}C] α-ketoglutarate by isocitrate dehydrogenase. Therefore the α-ketoglutarate synthesized anaplerotically has approximately half of the specific radioactivity of the original substrate

0175399.01100

635 359
723

$H^{14}CO_3$, depending on the degree of randomization of the label in oxaloacetate. This is also true of the glutamine synthesized from the [5-^{14}C] α-ketoglutarate.

The specific activity of glutamine was measured in the retinal tissue extracts incubated with 0 2 mM pyruvate and $H^{14}CO_3$ for 10, 20, 40 and 60 minutes. Only the tissue glutamine (not medium) is reported. Specific radioactivity of glutamine in the tissue was constant between 10 and 60 minutes. After 20 minutes of incubation the mass amount of glutamine in the tissue was 4 50 ± 0 44 nmoles/mg, and its specific radioactivity was 1970 ± 115 dpm/nmol or 0 158 ± 0 009 dpm/nmol of the bicarbonate specific activity Thus indicates that about 32% of the glutamine was produced by anaplerosis and pyruvate carboxylase.

The specific radioactivity of retinal glutamate (269 ± 8 dpm/nmol) was lower than that of glutamine and also constant as a function of time from 10-60 min. It was only 14% of the specific activity of glutamine. This suggests that glutamate metabolic turnover in the neurons is rapid with respect to anaplerotic synthesis. However, since neuronal glutamate turnover cannot replenish the glutamate carbon skeleton lost during neurotransmission, the anaplerotic pathway is of prime importance in maintaining neuronal glutamate levels. The present data show unequivocally that the anaplerotic pathway provides a large (≈32%) proportion of the glutamine required for glutamate replenishment.

5017539 9.01100

636 724

Synthesis of retinal glutamate and glutamine is partially dependent on branched chain amino acid transamination

Recent studies of glutamate synthesis in cultured astrocytes suggested that the conversion of α-ketoglutarate to glutamate could act as a rate-controlling step in anaplerotic synthesis of glutamate. Several groups have indicated that the α-amino group of glutamate cannot be supplied as ammonia and must therefore be supplied by transamination of α-ketoglutarate with another amino acid Kanamori, K., Ross, B.D , and Kondrat, R.W (1998) *J. Neurochem.* 70, 1304-1315, Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685, including our own Haberg, A., Qu, H., Bakken, I.J , Sande, L.M., White, L.R., Haraldseth, O , Unsgard, G , Assley, J , Sonnewald, U (1998) *Dev Neurosci.* 20, 389-398. Branched chain amino acids are likely nitrogen contributors since they can cross the blood-brain and blood-retinal barriers efficiently Hutson and coworkers have proposed that a nitrogen shuttle between neurons and glia which involves branched chain amino acids and two BCAT isoenzymes, one in neuronal cytosol (BCATc) and one in glial mitochondria (BCATm) can also provide the needed nitrogen. Hutson, S.M., Berkich, D , Down, P., Xu, B., Aschner, M., and LaNoue, K.F (1998) *J Neurochem.* 71, 863-874 According to this hypothetical shuttle, neuronal BCATc facilitates glial BCATm conversion of α-ketoglutarate to glutamate by providing BCAA regenerated in the neurons (cf Figure 1)

As a first step toward investigating the role of the BCAT isoenzymes in *de novo* glutamate synthesis in the retina, immunoblotting with BCATm and BCATc specific antibodies was used to determine whether the BCAT isoenzymes are expressed in rat retina. As shown in Figure 3, both BCATc and BCATm are expressed in the retina at levels

601753999 .011100

637
725

that are comparable to those found in whole brain homogenates. Therefore, freshly dissected rat retina is an appropriate intact neural system in which to test the concept of nitrogen shuttling between neurons and glia.

The leucine analog gabapentin (GBP) is a neuroactive drug which inhibits BCATc, but not BCATm: Su, T.-Z., Lunney, E., Campbell, G., Oxender, D.L. (1995) *J. Neurochem.* 64, 2125-2131. It was confirmed that GBP inhibits the synthesis of leucine in freshly dissected rat retinas (data not shown). The effect of GBP on the synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$ in *ex vivo* rat retinas was then measured. As shown in Figure 4, 1 mM GBP reduced formation of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine to 71% of control values (2.26 ± 0.05 versus 3.18 ± 0.12 nmol/mg, $p<0.001$). Addition of 200 μM each of leucine, isoleucine and valine reversed the inhibition to 89% of control (2.84±1.15 nmol/mg, $p<0.01$ versus GBP alone). There was no effect of GBP on either ATP or creatine phosphate indicating that the GBP did not impair retinal bioenergetic processes. The small increase in incorporation of carbon 14 into lactate and citric acid cycle intermediates (from 1.93 ± .06 to 2.12 ± 0.13) due to the presence of 1 mM GBP was not significant. Incorporation of the label into all of the metabolites is shown in Table II.

Further experiments were carried out to investigate dose/response properties of GBP. Freshly dissected retinas were incubated for 20 minutes in buffer A containing either 0, 0.2, 1, or 5 mM GBP. As shown in Figure 5, increasing the concentration of GBP over 1 mM did not significantly increase the extent of its inhibition of the synthesis of ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine from $H^{14}CO_3$. Again GBP has no influence on formation of citric acid cycle intermediates, lactate and pyruvate (Figure 5). This

SO1752S9-011100

638
726

supports the proposal that the site of GBP inhibition of glutamate synthesis is the BCAT mediated conversion of α-ketoglutarate to glutamate.

Discussion

The studies described evaluated mechanisms for maintenance of CNS glutamate levels. Previous studies showed that glutamine synthetase is required in retinas and hippocampal slices to maintain levels of neuronal glutamate: Su, T.-Z., Lunney, E., Campbell, G., Oxender, D.L. (1995) *J. Neurochem.* 64, 2125-2131. Immunocytochemical measurements indicate that 90% or more of retinal and whole brain glutamate is neuronal and that inhibition of glutamine synthetase for 90 minutes depletes the neuronal glutamate pool to negligible levels: Ottersen, O.P., Zhang, N., and Walberg, F. (1992) *Neurosci.* 46, 519-534. This demonstrated that glutamine synthetase is required for maintenance of neuronal glutamate. Although glutamate can be synthesized in neurons from α-ketoglutarate, lack of pyruvate carboxylase or another anaplerotic enzyme prevents replenishment of α-ketoglutarate, and thus, precludes net glutamate synthesis within the neurons except from glutamine via glutaminase.

In this example the sources and control of glutamine synthesis was investigated by incubating excised retinas with $H^{14}CO_3$ and measuring the appearance and specific radioactivity of ^{14}C-glutamine and ^{14}C-glutamate. More ^{14}C-glutamine is synthesized in the presence of 5 mM pyruvate than in the presence of 0.2 mM. This indicates that pyruvate carboxylase activity influences the rate of glutamine synthesis. However, lack of sensitivity of this control is demonstrated by the observation that when pyruvate is increased from 0.2 mM to 5 mM the magnitude of the increase in pyruvate carboxylase flux (80.3%) is not directly translated into an

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

263
639
727

equivalent increase in ^{14}C-glutamate plus ^{14}C-glutamine (69 0%). Flexibility of the control is provided by the potential for citric acid cycle decarboxylation and pyruvate recycling. The pyruvate dependence of total $H^{14}CO_3$ fixation in retinal tissue was similar to that seen in cultured isolated astrocytes. Gamberino, W C , Berkich, D.A., Lynch, C.J., Xu, B., and LaNoue, K.F (1997) *J Neurochem.* 69, 2312-2325 However, in astrocytes, which have no way to regenerate endogenous BCAA used to transaminate α-ketoglutarate, the pyruvate-induced increases in CO_2 fixation were not translated into increases in ^{14}C-glutamate and ^{14}C-glutamine levels. Instead, the carbon 14 accumulated solely in citric acid cycle intermediates and into "recycled" pyruvate.

5017539 9 .011100

In the retinal studies reported here, the specific radioactivity of glutamine at steady state was 0 158 of the bicarbonate specific activity Since, approximately half of the ^{14}C incorporated into oxalacetate is retained in α-ketoglutarate, the results show that ≈ 32% of the glutamine is derived from $H^{14}CO_3$ Thus is the first direct estimate of the contribution of anaplerosis to glutamine synthesis in a neuronal tissue. Previous estimates have been indirect, and involved isotopomer analysis of NMR spectra following infusion of ^{13}C glucose (3-5, 11-13) into intact brains. Estimates of the contribution of pyruvate carboxylation to glutamine synthesis using these NMR methods have been lower than the present one, and range from less than 1% (3) to 5-10% (4,5) to 20-25%. Shank, R.P , Bennet, G.S., Freytag, S.O , and Campbell, G.L. (1985) *Brain Res.* 329, 364-367, Griffen, J.L., Rae, C., Radda, G.K., and Matthews, P.M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 297-307, depending largely on initial assumptions of the mathematical models employed. The present results suggest that glial pyruvate carboxylation and the conversion of citric acid

36A
GAD 728

cycle intermediates to glutamate and glutamine are likely to be quantitatively important for retinal function and possibly for whole brain function.

The observation that GBP slows the conversion of citric acid cycle intermediates to glutamine and glutamate strongly suggests that neuronal synthesis of BCAA by BCATc is necessary for optimal rates of amination of α-ketoglutarate to glutamate. A reasonable scheme for their involvement in this process is shown in Figure 1

The results, which demonstrate inhibition of ^{14}C-glutamate and ^{14}C-glutamine synthesis from $H^{14}CO_3$ by GBP and reversal of the inhibition by BCAA, are consistent with the described shuttle. The hypothesis also provides a possible explanation for the anti-epileptic action of GBP Taylor, C.P , Gee, N S., Su, T.Z., Kocsis, J.D , Welty, D.F., Brown, J.P., Dooley, D.J , Boden, P , Singh, L. (1998) *Epilepsy Res.* 29, 233-249 Indeed, decreased glutamate synthesis is a common action of GBP and the anti-epileptic carbonic anhydrase inhibitors. Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W S , LaNoue, K.F , Lynch, C J (1997) *Dev. Neurosci.* 19, 162-171 Also, Maple Syrup Urine Disease, the hereditary ailment caused by a mutation of the gene for branched chain keto acid dehydrogenase, if untreated induces high serum BCAA in patients and subsequent neurological abnormalities Chuang, D I. and Shih, V.E. (1995) *In The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, S , and Valle, D (McGraw-Hill) pp 1239-1277, which may be related to abnormal regulation of glutamate synthesis. Finally, the implications of nitrogen shuttling during glutamate synthesis must be studied further in light of the efficacy of GBP in the treatment of

60175399 "0110D

neuropathic pain. Ottersen, O.P , Zhang, N , and Walberg, F (1992) *Neurosci.* 46, 519-534 and neurodegeneration, Chuang, D I and Shih, V.E. (1995) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Schriver, C R., Beaudet, A.L., Sly, S , and Vaule, D (McGraw-Hill) pp 1239-1277, Rothstein, J.D and Kuncl, R.W (1995) *J Neurochem.* 65, 643-651

EXAMPLE 37

Enzyme preparation. Frozen rat brains were thawed on ice and minced into fine pieces. For each brain 5 ml of isotonic buffer [225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM MOPS (pH 7 1), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT containing leupeptin, pepstatin and PMSF] was added. The samples were homogenized in Potters homogenizer (B Bran Biotech International) at 500 rpm for ten strokes, followed by additional ten strokes at 800 rpm. The homogenates were centrifuged in Beckman J2-M1 centrifuge with rotor JA-20 at 19, 000 rpm for 1 hr The supernatant was dialyzed with at least three changes of dialysis buffer (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM MOPS pH 7 1, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1 mM DTT) for 24 hrs. The resulting enzyme was stored at –80 ^{0}C for further assays.

Assay of BCAT: The reaction was done in 1 5 ml Eppendorf tubes in a volume of 100 µl containing 50 mM Tris-HCL (pH 8.3), 25 µM [^{14}C] L-leucine, 10 mM 2-oxoglutarate, 15 µM pyridoxal phosphate, 1 mM DTT, and enzyme. The solutions for the reaction mixture were made in 10-fold concentrations. After 10 min incubation at room temperature (22 ^{0}C), the reaction was stopped by adding 100 µl of 15 mM p-nitrophenyl hydrazine in 2 M HCL. After a few minutes, 1 mL of a toluene-based scintillation liquid (4 5 g of PPO and 0 5 g of bis-MSB in 1 liter of toluene) was added, the tube was capped and mixed thoroughly with a Vortex mixer Then the tubes were centrifuged at 13, 500 rpm (Eppendorf centrifuge 5415C) for 10 min. Six hundreds µl of organic layer from each tube was placed into

5017539 9 .01110

366
642
730

scintillation vials, followed by adding 10 ml of scintillation cocktail for counting.

Example #	RBCATc IC50 (uM)
1	146
2	1136
3	1660
4	2515
5	2934
6	2620
7	2165
8	74
9	120
10	121
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-
19	-
20	-
21	-
22	389
23	2121
24	942
25	170
26	-
27	-

60175399.011100

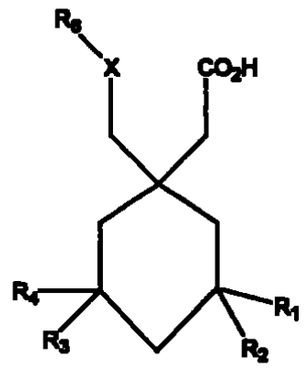
28	181
29	391
30	2250
31	908
32	243
33	1018
34	-
35	1768

00TTTO'66ES4T09

6AA732

CLAIMS

1 A compound of Formula IV



IV

R1-R4 are hydrogen or alkyl,

X is NR5 or O;

R5 is hydrogen or alkyl,

R6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R_1-R_4 are each hydrogen the R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

2. A compound according to Claim 1 wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are alkyl, R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is alkyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R_4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6, X is O, R_6 is alkyl, R_6 is benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl.

3 A compound according to Claim 1 wherein R_2 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_3 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen, R_1 is methyl and R_2-R4 are hydrogen, R_5 is hydrogen, X is NR_6, R_6 is alkyl, R_6 is

001110 "66E7E709

645 733 369

benzyl, R_6 is acetyl, R_6 is phenylalkyl, R_6 is cycloalkyl, R_6 is trifluoroalkyl, R_6 is alkylcycloalkyl, R_6 is alkoxy; and R_6 is allyl.

4 A compound according to Claim 1 wherein R_3 and R_4 are hydrogen and R_1 and R_5 are methyl, R_1-R_4 are hydrogen.

5 A compound according to Claim 1 and selected from.
(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,

EP1175399 A1

trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

EP1753399.011100

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isobutylammo-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

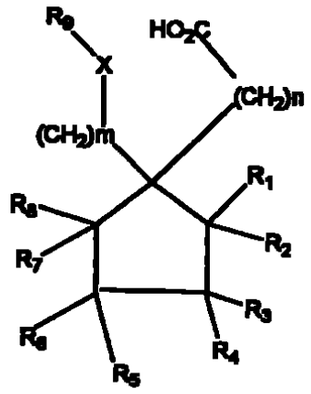
[1-(Isopropylammo-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

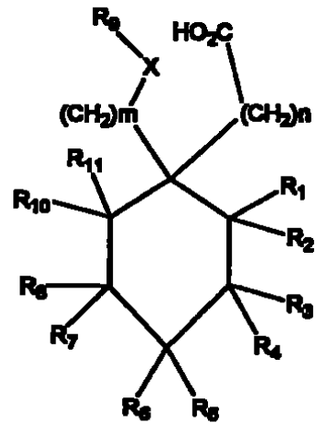
[1-(Benzylammo-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

6. A method for treating diabetic retinopathy comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formulas I, II, and/or III to a patient in need thereof

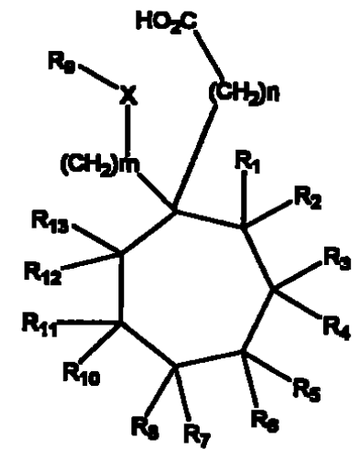
60175399 .011100



I



II



III

wherein

649
737
323

R_9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

$R_1 - R_8$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

$X = NR_{14}$, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

7 The method of Claim 6 wherein m and n are 1, X is NR_{14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_8 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_8 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R_9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_8 are H, or R_2 is methyl.

8 The method of Claim 6 wherein R_9 is alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_9 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_8 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

9 The method of Claim 6 wherein the compound is selected from.

(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,

{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,

WO 01/75399 PCT/US01/11100

650 738 324

1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,

EP1754705 A1

657 739 325

trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,
(1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;
(cis/trans)-(3R)-(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Benzylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;
1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

001753999.01100

652 740 326

1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,

1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

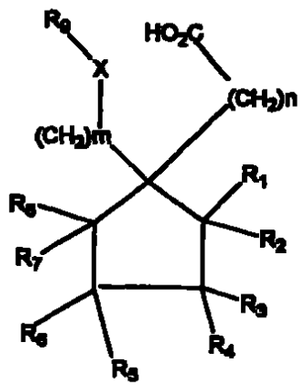
(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

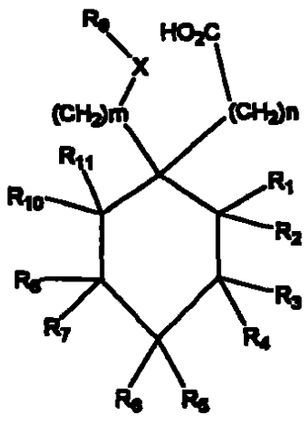
EP 0752399 A1

653 741

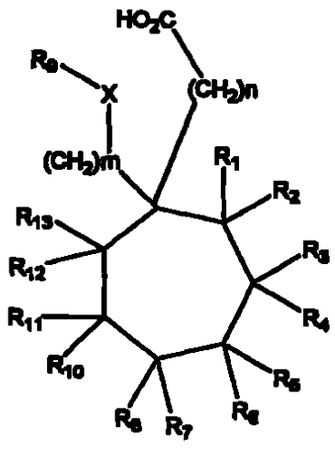
A method for inhibiting the branch chain amino acid-dependent aminotransferase in a patient in need thereof comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formulas I, II, and/or III



I



II



III

EP1755399-011100

wherein

R_9 is H, alkyl, cycloalkyl, substituted alkyl containing halogen, amine, alkoxy, cycloalkyl, or hydroxy; allyl, alkynyl, acetyl, sulfonyl, phenyl, benzyl, or arylalkyl,

m and n are independently an integer of 1-3,

$R_1 - R_8$ and $R_{10} - R_{14}$ are independently H, alkyl, or substituted alkyl, and

X = NR_{14}, O, or S

where there is more than one stereoisomer, each chiral center may be independently R or S, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof

11 The method of Claim 10 wherein wherein m and n are 1, X is NR_{14}, R_9 is H, R_4 is methyl, R_4 and R_5 are methyl, R_8 is methyl, R_{10} is methyl, R_7 and R_8 are methyl, R_4 and R_8 are methyl, R_1-R_8 and R_{10}-R_{13} are H, R_9 is alkyl, R_9 is benzyl, R_{14} is alkyl, R_9 is arylalkyl, R_9 is cycloalkyl, R_1-R_8 are H, R_1-R_8 and R_{10}-R_{11} are H, R_1-R_2 and R_7-R_8 are H, or R_2 is methyl.

12 The method of Claim 10 wherein R_3 is alkyl, R_1-R_8 and R_4-R_{11} and R_{14} are hydrogen, and m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is NR_{14}, R_3 and R_{11} are alkyl, R_1-R_2 and R_4-R_{10} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, R_9 is alkyl, and X is NR_{14}, and R_1-R_{11} and R_{14} are hydrogen, m and n are 1, and X is O

60175399.010100

655
743

13 The method of Claim 10 wherein the compound is selected from.
(1-Allylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
(1-Prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
{1-[(2,2,2-Trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
{1-[(3,3,3-Trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β- (1-Allylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-{(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Allylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-prop-2-ynylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(2,2,2-trifluoro-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(3,3,3-trifluoro-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-3-Methyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(4,4,4-trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-{(1R,3R)-1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-3-methyl-cyclohexyl}-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Ethylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-3-Methyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid,
trans-((1R,3R)-1-Butylaminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,

001753999.011100

trans-((1R,3R)-1-Hydroxymethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid,
1α,3β,5β-{1-[(Hydroxymethyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid,
1α,3β,5β-(1-Ammomethyl-3,5-diethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;

trans-(1R,3R)(1-Aminomethyl-3-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Aminomethyl-2-methyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(1-Aminomethyl-3,3-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride;
(±)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;
(cis/trans)-(3R)-(1-Ammomethyl-3-methyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;

(+)-(trans)-(1-Aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid hydrochloride;
1α,3β,5β-(1-Aminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride,
1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Ethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt;
1α,3β,5β-(1-Benzylammo-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid, hydrochloride salt,
1α,3β,5β-(1-Dimethylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-Butylaminomethyl-3,5-dimethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-{1-[(Benzyl-methyl-amino)-methyl]-3,5-dimethyl-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

1α,3β,5β-(3,5-Dimethyl-1-methylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid, hydrochloride salt,

1α,3β,5β-[1-(Acetylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid,

1α,3β,5β-(1-(Isobutylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt;

1α,3β,5β-[3,5-Dimethyl-1-(phenethylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-{3,5-Dimethyl-1-[(3-phenyl-propylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclobutylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

1α,3β,5β-(1-(Isopropylamino-methyl)-3,5-dimethyl-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

1-Aminomethyl-1-cyclohexane-acetic acid,

1-Aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-aminomethyl-1-cyclopentane-acetic acid,

Sodium salt of 1-(hydroxymethyl)cyclohexane-acetic acid,

{1-[(2-Methyl-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

{1-[(4,4,4-Trifluoro-butylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid, hydrochloride salt;

(1-Ethylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

{1-[(Cyclopropylmethyl-amino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt;

EP1753399 "01110"

{1-[(2-Hydroxy-1-methyl-ethylamino)-methyl]-cyclohexyl}-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isobutylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Propylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt,

[1-(Isopropylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt,

(1-Cyclohexylaminomethyl-cyclohexyl)-acetic acid hydrochloride salt, and

[1-(Benzylamino-methyl)-cyclohexyl]-acetic acid hydrochloride salt.

14 A method for treating neurological disorders, depression, anxiety, panic, mania, bipolar disorders, antiflammatory diseases, glaucoma, pain or gastrointestinal damage comprising the step of administering a therapeutically effective amount of a compound of Formula IV to patient in need thereof.

R1-R4 are hydrogen or alkyl,
X is NR5 or O;
R5 is hydrogen or alkyl,

R6 is hydrogen, alkyl, benzyl, acetyl, arylalkyl, alkoxy, cycloalkyl, allyl, alkylcycloalkyl, alkoxy, cycloalkyl, alkylcycloalkyl, trisubstituted halogenalkyl, and wherein R_1-R_4 are each hydrogen the R_6 is not hydrogen or methyl, or a pharmaceutically acceptable salt, ester, prodrug, or amide thereof.

501753969.011100

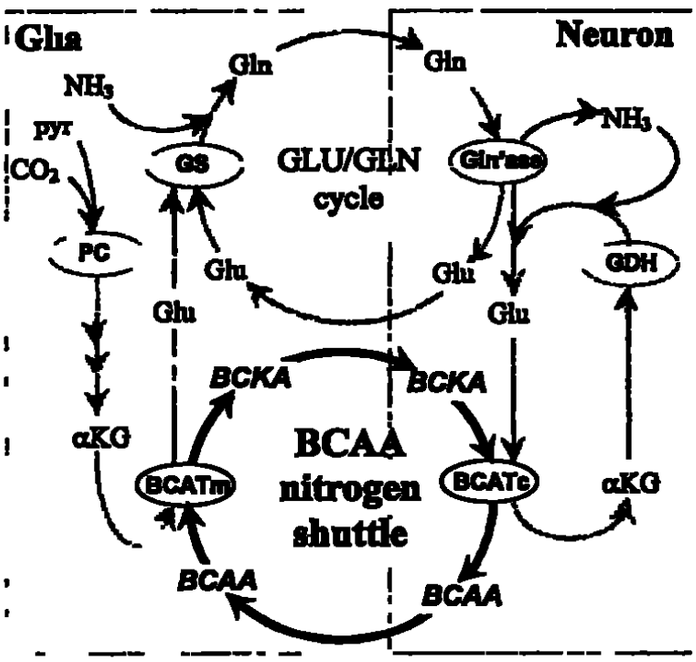
659 747 352

ABSTRACT

The present invention is directed to a method for the prophylactic and therapeutic treatment of diabetic retinopathy The method involves the administration of an inhibitor of the branch chain amino acid-dependent aminotransferase (BCAT) pathway to an animal, such as a mammal, in particular a human, in an amount sufficient to treat the retina for diabetic retinopathy prophylactically or therapeutically The present invention is also directed to several novel inhibitors of the BCAT pathway

001753'99.0110D

Figure 1


Glia
Neuron
Gln
Gln
NH3
NH3
pyr
CO2
GS
GLU/GLN
cycle
Gln'ase
PC
Glu
Glu
GDH
Glu
Glu
BCKA
BCKA
αKG
BCAA
nitrogen
shuttle
BCATm
BCATc
αKG
BCAA
BCAA

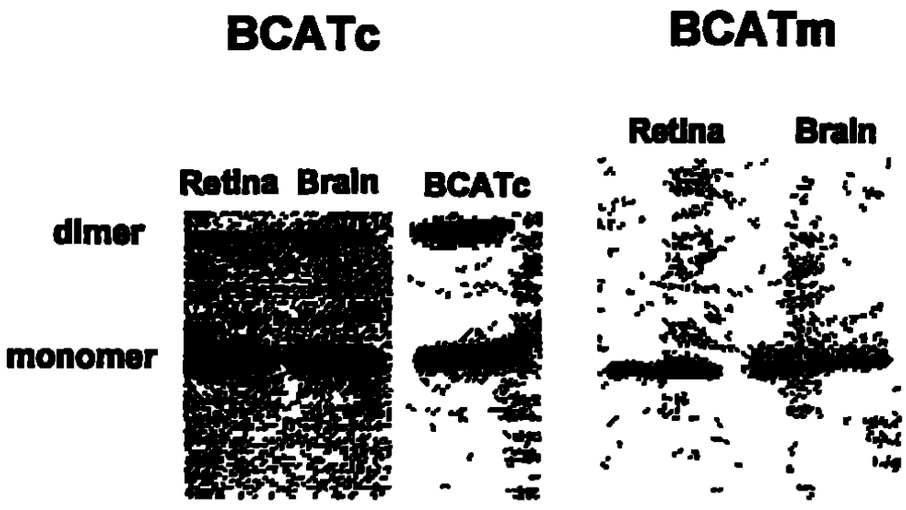
DOCKET: 66252705

Figure 2

Express Mail No. EV767053150US

667 750 386

Figure 3



EXPRESS MAIL NO. EV760551508US
01752299.011100

Figure 4

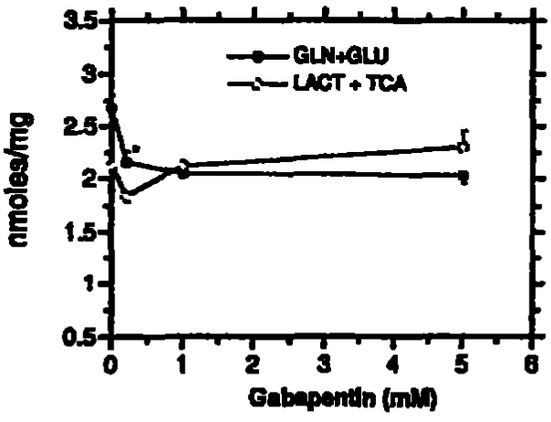
Express Mail No. EJ767053150US

DOCKET: 6653709

ODITO: 96547598 011100

Express Mail No. EV760531503US

Figure 5



12844-04

666 753

TRADUCCION----------

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA ----------

A quien corresponda DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos ------

---

----------21 de septiembre de 2000----

Se certifica por el presente que el documento adjunto es una copia fiel de los registros que obran en la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos de los papeles de la solicitud de patente que se detalla más abajo, la cual ha cumplido con los requisitos para otorgarse una fecha de registro segun 35 USC 111 ----------

NUMERO DE SOLICITUD 60/175 399----------

FECHA DE REGISTRO 11 de enero de 2000 ----------

Por autoridad del Comisionado de Patentes y Marcas [Hay una firma ilegible] N WILLIAMS, Funcionario de certificaciones --

---

[Hay un sello al agua de color dorado que dice] Oficina de Patentes y Marcas, Estados Unidos de Norteamérica----------

---

Tipear Un signo más (+) dentro de este casillero → + -------

Caso Numero : A00000151L2-01-MJA----------

CARATULA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTES (Gran Empresa)----------

667 754

[Sobre el margen izquierdo aparece un código de barras con los siguientes datos] JC575 U S PTO 01/11/00----------

[Sobre el margen derecho aparece un código de barras con los siguientes datos] JC541 U S PTO 60/175399 01/11/00---------

[Sobre el mismo margen dice] CORREO EXPRESO No EJ676053150US----------

La presente es una solicitud para presentar una SOLICITUD PROVISIONAL segun CFR 37 1 53 (c)----------

INVENTOR(ES) SOLICITANTE(S) ----------

NOMBRE DE PILA Justin Stephen----------

APELLIDO Bryans----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) Dean Cottrage, 3 West Wickham Road, Balsham CB 1 6DZ, Reino Unido ----------

---

NOMBRE DE PILA Lain-Yen----------

APELLIDO Hu----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 4881 S Ridgeside Circle, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Susan M ----------

APELLIDO Hutson----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 1123 W 4th St Winston-Salem, North Carolina 27101 ----------

---

NOMBRE DE PILA Kathrin Foley----------

663 755 392

APELLIDO LaNoue----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 417 Hilltop Rd , Hummelstown, PA 17036 ----------

---

TITULO DE LA INVENCION (Máximo 280 caracteres)----------

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABETICA----------

---

DOMICILIO POSTAL ----------

Dirigir Toda la correspondencia a [ ] Número de cliente [En blanco] (por favor colocar la etiqueta con el código de barras del número de cliente aqui) o,----------

[X] Nombre de la Compañia o individual Michael J Atkins ----

Warner Lambert Company----------

2800 Plymouth Road----------

Ann Arbor----------

Estado Michigan, **Código postal** 48105, **Pais** Estados Unidos de Norteamérica, Teléfono 734-622-5218, Fax 735-622-1553-----

---

PARTES DE LA SOLICITUD QUE SE ADJUNTAN (tildar todas las que se presentan)----------

(X) Memoria descriptiva, Numero de páginas 90----------

(-) Dibujos, Numero de páginas 5----------

669
756

(X) Otros (especificar) ----------

13 reivindicaciones en 15 páginas----------

Resumen en 1 página----------

FORMA DE PAGO (tildar una)----------

(X)Se adjunta un cheque u orden de dinero para cubrir el arancel de presentacion----------

(-) El comisionado está autorizado por la presente a cambiar los aranceles y crédito de presentación y el Numero de Cuenta de Depósito 23-0455----------

MONTO DEL ARANCEL DE PRESENTACION PROVISIONAL ($) 150 00------

---

La invención fue realizada por una oficina del Gobierno de los Estados Unidos o según un contrato con una oficina del Gobierno de los Estados Unidos (X) No, (-) Sí, el nombre de la agencia del Gobierno de los Estados Unidos y el numero del contrato del Gobierno son (en blanco)----------

Saluda atentamente,----------

FIRMA (hay una firma ilegible) Fecha 11 de enero de 2000 --

Nombre impreso o a máquina Michael J Atkins----------

Número de matricula (si corresponde) 35 431----------

SOLAMENTE PRESENTACION DE SOLICITUD PROVISORIA----------

ENVIAR A Casilla de Solicitud de Patentes Provisorias, Comisionado Asistente para Patentes, Washington, D C 20231---

[Pagina 1 de 2] P19LARGE/REV04----------

670
757

CARATULA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTES (Gran Empresa)----------

NOMBRE DE PILA Erich----------

APELLIDO Lieth----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 1425 Bradley Ave , Hummelstown, PA 17036 ----------

---

NOMBRE DE PILA Michael Francis----------

APELLIDO Rafferty----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 3711 Rolling Ridge Court, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Todd Robert----------

APELLIDO Ryder----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 521 N Ashley Street, Ann Arbor, Michigan 48103 ----------

---

NOMBRE DE PILA Ti-Zhi----------

APELLIDO Su----------

DOMICILIO (Ciudad y estado o pais extranjero) 2519 Meade Court, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

NOMBRE DE PILA Devin Franklin----------

APELLIDO Welty----------

671
758

395

DOMICILIO (Ciudad y estado o país extranjero) 2213 Placid Way, Ann Arbor, Michigan 48105 ----------

---

Certificado de Envío por correo Expreso ----------

Certifico que esta solicitud y el arancel que se adjunta se deposita el día 11 de enero de 1999, con el Servicio postal de los Estados Unidos "Oficinal postal de Correo Expreso al Destinatario", segun C F R 37, 1,10 y está dirigida al Comisionado Asistente de Patentes, Washington, D C 20231----

Firma de la persona que envía la correspondencia [Aparece una firma ilegible]----------

Nombre impreso o a máquina de la peraona que envía la correspondencia Linda A Zerby----------

SOLAMENTE PRESENTACION DE SOLICITUD PROVISORIA----------

ENVIAR A Casilla de Solicitud de Patentes Provisorias, Comisionado Asistente para Patentes, Washington, D C 20231---

[Pagina 2 de 2] P19LARGE/REV04----------

Correo expreso No EJ676053150US----------

PD-A0000151L2-01-MJA----------

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATIA DIABÉTICA----------

---

759

INHIBIDORES DE AMINOTRANSFERASA DEPENDIENTE DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA DIABETICA

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Más de 14 000 000 de personas en los Estados Unidos padecen diabetes Todas las personas con diabetes están en riesgo de complicaciones retinales Sin embargo, las personas que sufren la diabetes de tipo I, es decir insulino dependiente, se enfrentan a un mayor riesgo de pérdida de la visión severa que las personas que sufren la diabetes de tipo II, es decir no insulino dependiente

Inicialmente, el nivel alto de glucosa en sangre en las personas diabéticas produce un aumento en los factores crecimiento en sus ojos Esta condición se denomina "etapa de retinopatía pre-diabética" y puede conducir a la retinopatía diabética total, si no se la trata profilácticamente

La retinopatía afecta a la mayor parte de las personas diabéticas en alguna medida durante sus vidas Es la causa principal de la ceguera en los estadounidenses de 20 a 74 años en la actualidad, y se espera que deteriore la visión en aproximádamente un tercio de las personas diabéticas en los

623 760 397

Estados Unidos Cada año en los Estados Unidos, ocurren tantos como 40 000 nuevos casos de ceguera entre las personas diabéticas (CDC, datos no publicados, 1993) Las personas diabéticas son 25 veces más propensas que la población general a quedar ciegas debido a la retinopatía

La retinopatia diabética tiene dos etapas una etapa no proliferativa, que típicamente ocurre primero, y una etapa proliferativa La etapa no proliferativa, que también se denomina "retinopatía diabética de fondo", se caracteriza por el engrosamiento de la membrana de base, la pérdida de pericitos retinales, las anormalidades microvasculares, los microaneurismas intraretinales, y las hemorragias retinales (también llamadas hemorragias de "mancha de punto"), edema retinal, en particular el edema macular diabético, el cierre de vasos capilares asociado con la isquemia retinal o la mala perfusión retinal (es decir el mal desarrollo de vasos) y exudados blandos y duros La etapa proliferativa, que afecta a aproximadamente 700 000 estadounidenses (Chen et al, J Miss State Med Assoc 36(7) 201-208 (1995)), se caracteriza por la neovascularización y el crecimiento fibrovascular (es decir, la cicatrización que involucra a elementos gliales y fibrosos) desde la retina o el nervio óptico sobre la superficie interior de la retina o el disco o la cavidad vítrea

398
6A 761

La etapa proliferativa puede conducir al glaucoma rubeótico o neovascular El edema macular puede ocurrir en cualquier etapa y, junto con las complicaciones surgidas de la neovascularización retinal, son los dos principales problemas retinales que causan la pérdida de la visión relacionada con la diabetes

Si bien las etapas patológicas de la retinopatía diabética se han descripto bien, los eventos moleculares que subyacen a la retinopatía diabética son pobremente comprendidos Esto se debe, en parte al hecho de que la enfermedad avanza durante diez a treinta años, segun cada individuo

el control estricto de la glucemia y la hipertensión y el examen oftálmico de la diabetes parece beneficioso para prevenir la enfermedad El tratamiento actual consiste en la observación regular por un oftalmólogo, la fotocoagulación por láser y la vitrectomia

El edema macular que amenaza o involucra al centro macular se trata con la fotocoagulación macular focal Las cauterizaciones por láser de intensidad moderada, pequeñas (de 50 mu de diámetro), son apuntadas a las áreas de pérdidas en la mácula (Murphy, Amer Family Physician 51(4) 785-796

599
615.762

(1995)) Si el edema macular persiste, puede ser necesario volver a tratarlo

Los pacientes con retinopatía no proliferativa severa a muy severa y los pacientes que están en riesgo de sufrir retinopatía proliferativa o que ya sufren retinopatía temprana o avanzada, son tratados con fotocoagulación difusa o panretinal La fotocoagulación panretinal consiste en 1 500-2 000 cauterizaciones con láser, que tienen 500 mu de diámetr, en la porción periférica media y periférica de la retina (Murphy (1995), citada arriba)

El mecanismo bioquímico mejor documentado para el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la diabetes es la vía del sorbitol En la vía del sorbitol, la enzima de reductasa de aldosa cataliza la conversión de la glucosa en sorbitol y de la galactosa en galactitol La reductasa de aldosa tiene baja afinidad con la glucosa Por consiguiente, cuando las concentraciones de glucosa son normales, la vía está inactiva Durante la hiperglucemia, la vía del sorbitol se activa La activación de la vía del sorbitol es importante para los pericitos retinales, por ejemplo, que no requieren insulina para la penetración de la glucosa En forma similar, las células capilares retinales parecen contener cantidades

400
676 763

sustanciales de reductasa de aldosa (Ferris, Hospital Practice 79-89 (15 de mayo de 1993)

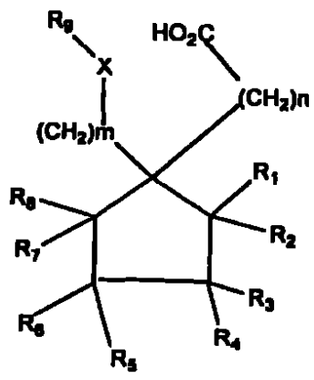
Dada la prevalencia del a retinopatía diabética, aun existe una necesidad de un tratamiento profiláctico y terapéutico efectivo de la enfermedad Por consiguiente, el principal objetivo de la presente invención es proporcionar un método para tratar profilácticа y terapéuticamente la retinopatía diabética, incluyendo el tratamiento en la etapa de la retinopatía prediabética, en la etapa de la retinopatía no proliferativa, y en la etapa de la retinopatía diabética proliferativa Éste y otros objetivos de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada que se ofrece en la presente invención

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatía diabética, que incluye el tratamiento en la etapa de la retinopatía prediabética, en la etapa de la retinopatía diabética no proliferativa y en la etapa de la retinopatica diabética proliferativa El método comprende la administración de un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada Preferentemente, el

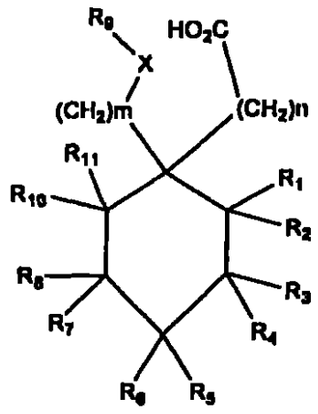
764

inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) es un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III

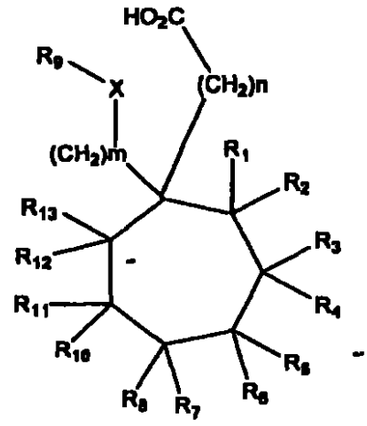


I

402
678 765



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halógeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo, alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un numero entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

X = NR_{14}, O, o S,

donde hay más de un estereoisómero, cada centro quiral puede ser en forma independiente R o S, o una sal, ester, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

Los compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula I, II o III en donde m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H, R_9 es alquilo, R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H, R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

Compuestos más preferidos son aquellos de la Fórmula II en donde R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es O

Compuestos especialmente preferidos se seleccionan de

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,
Ácido (1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

681 768

A05

Ácido trans-[(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil]-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-[(1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético;

407
683 770

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

684 771 408

Sal de clorhidrato del acido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

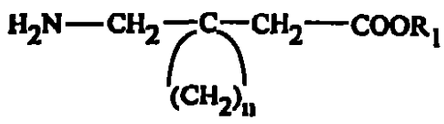
Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

Varios de los compuestos descriptos por las Fórmulas I, II y III son conocidos

Los compuestos de la Fórmula A



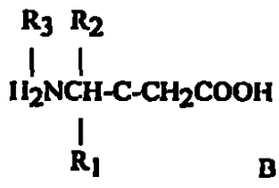
A

en donde R_1 es hidrógeno o un radical de alquilo inferior y n es 4, 5 o 6 son conocidos en la Patente Estadounidense Numero 4 024 175 y la Patente Estadounidense divisional Número 4 087 544 Los usos revelados son efecto protector contra el calambre inducido por la tiosemicarbazida, acción protectora contra el calambre de cardiazol, las enfermedades cerebrales, la epilepsia, los ataques de desvanecimiento, la hipocinesia,

685 772 409

y los traumas craneales, y el mejoramiento de las funciones cerebrales Los compuestos son utiles en pacientes geriátricos Las patentes se incorporan en la presente invención como referencia

Los compuestos de la Fórmula B

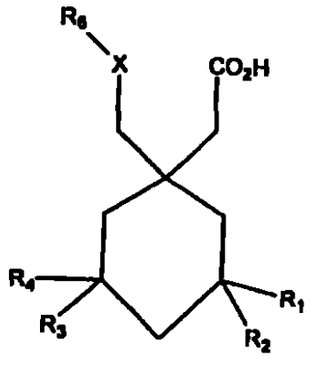


B

o una sal farmacéuticamente aceptable de ellos, en donde R_1 es un grupo alquilo de cadena recta o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, fenilo o cicloalquilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, R_2 es hidrógeno o metilo, y R_3 es hidrógeno, o carboxilo son conocidos en la Patente Estadounidense Numero 5 563 175 y sus diversas divisionales Estas patentes se incorporan en la presente invención como referencia

La presente invención también revela compuestos novedosos de la Fórmula IV

686 773



IV

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrógeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmacéuticamente aceptable de él Al igual que los compuestos de las Formulas I, II y III, los compuestos son utiles para el tratamiento profiláctico y terapéutico de la retinopatía diabética, incluyendo el tratamiento en la etapa de la retinopatía prediabética, en la etapa de la retinopatía diabética no proliferativa y en la etapa de la retinopatía diabética proliferativa

Los compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula IV en donde R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son alquilo, R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es

687 774

alquilo y R_2-R_4 son hidrogeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, X es O, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenialquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

Otros compuestos preferidos son aquellos de la Fórmula IV en donde R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrogeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenilalquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

Compuestos especialmente preferidos se seleccionan de

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

775

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

690 777

Clorhidrato del acido (1)-(Trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

694
778

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

696 779

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,
Sal de clorhidrato del acido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,
Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y
Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

La presente invención es también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la Fórmula IV y un portador farmacéuticamente aceptable

Los compuestos de la Fórmula II, tales como la gabapentina, son utiles para tratar diversas condiciones tales como un trastorno neurodegenerativo (US 5 084 479), la depresión (US 5 025 035), la ansiedad/pánico (US 5 792 796), la manía/trastornos bipolares (US 5 510 381), las enfermedades antiinflamatorias (WO 98 158641), la lesión gastrointestinal (WO 99 108670), el glaucoma y el dolor Como los compuestos de la Fórmula II y de la Fórmula IV funcionan ambos para afectar la via del BCAI y afectar la sintesis del glutamato, que está involucrada en cada una de las condiciones mencionadas anteriormente, los compuestos de la Fórmula IV son utiles para

693 780 ART

tratar las condiciones Por lo tanto, la presente invención tambien se refiere al uso de los compuestos de la Fórmula IV para tratar cada uno o más de uno de los trastornos neurodegenerativos (que incluyen en forma no taxativa ALS, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer), la depresión la ansiedad/pánico, la mania/trastornos bipolares, las enfermedades antiinflamatorias, el glaucoma, el dolor o la lesión gastrointestinal

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 Esquema que muestra la lanzadera de BCAT en la retina La característica de lanzadera está resaltada y muestra cómo los aminoácidos de cadena ramificada en la glia pueden transaminar un α-cetoglutarato para formar un glutamato El producto de BCKA se difunde en el intersticio (mostrado en gris) hacia las neuronas donde es convertido nuevamente en el aminoácido de cadena ramificada mediante la transaminación con glutamato a través del BCATc Las abreviaturas son las siguientes BCAA = aminoácido de cadena ramificada, GLU = glutamato, GLN = glutamina, Gln'asa = glutaminasa, pyr = piruvato, PC = carboxilato de piruvato, αKG = α-cetoglutarato, BCATm = aminotransferasa de cadena ramificada de la mitocondria, BCATc = aminotransferasa de

cadena ramificada citosólica, BCKA = cetoácido de cadena ramificada, GDH = deshidrogenasa de glutamato

Figura 2 Efecto de la concentración de piruvato en la incorporación de $H^{14}CO_3$ en glutamato más glutamina (A) y en el piruvato más lactato (B) por retinas *ex vivo* Se incubaron hemi-retinas a 37°C en condiciones estándar con $H^{14}CO_3$ a 25 mM durante 20 minutos El piruvato en el medio estaba a 0,2 o 5 mM Los valores mostrados son medio ± SEM (n= 4, * $p<0,05$) Abreviaturas gln+glu = suma de glutamina más glutamato, pyr+lact = suma de piruvato etiquetado más lactato

Figura 3 Expresión de las isoenzimas de BCAT en retinas de ratas La extracción de tejidos, SDS-PAGE,e inmunotransferencia se realizaron como se describió usando el conjunto de detección de ECL Se usaron el anticuerpo de péptido anti-BCATc de rata purificado por inmunoafinidad (1 1 000) y el anticuerpo anti-BCATm humano

Figura 4 La influencia de la gabapentina (GBP) y los aminoácidos de cadena ramificada sobre la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el glutamato más glutamina por retinas *ex vivo* Se incubaron semiretinas a 37°C en condiciones estándar con $H^{14}CO_3$ a 25 mM y piruvato a 0,2 mM durante 20 minutos En algunos casos la gabapentina (a 1 mM) se incluyó en el medio de

695 782 449

incubación y en otros se incluyó GBP (a 1 mM) más los tres aminoácidos de cadena ramificada (a 0,2 mM) Los valores mostrados son medios ± SEM de HCO_3 incorporado en glutamato más glutamina en 20 minutos (n=4, * p<0,001, ** p<0,01) Abreviaturas gln+glu = suma de glutamina etiquetada más glutamato

Figura 5 Influencia de la concentración de la gabapentina (GBP) en la incorporacion de $H^{14}CO_3$ en glutamato y glutamina en retinas ex vivo Las condiciones fueron similares a aquellas de la Figura 4, salvo por la concentración de la GBP Los valores mostrados son medios ± SEM (n=6-7, * p<0,05) Abreviaturas GLN+GLU = suma de glutamina mas glutamato, LACT+TCA = suma de lactato más intermedios del ciclo de TCA

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al descubrimiento de que la inyección intraocular de glutamato produce la pérdida de células ganglionares que está relacionada con las primeras etapas de la retinopatia diabética (Vorwerk et al, IOVS 37 1618-1624 (1996)) y de que un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoacidos de cadena ramificada, tal como la gabapentina por ejemplo, es efectivo

ADP
696 783

en la inhibición de la síntesis del glutamato, previniendo así la retinopatía diabetica Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento profiláctico y terapeutico de la retinopatia diabética, que incluye el tratamiento de la etapa de retinopatía prediabética, la etapa de la retinopatia diabética no proliferativa y la etapa de la retinopatia diabética proliferativa Por "profiláctico" se entiende la protección, total o parcial, de la retinopatía diabética, en particular el edema macular diabetic Por "terapéutico" se entiende el mejoramiento de la retinopatía diabética, propiamente dicha, y la protección, total o parcial, de otra retinopatía diabética, en particular el edema macular diabético

El método comprende la administración de un inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada, en una cantidad suficiente para tratar la retinopatía en forma profiláctica o terapéutica Cualquier inhibidor de la vía de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada puede ser usado en el método de la presente invención en la medida en que sea seguro y eficaz En la presente invención, "inhibidor de la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT)" se usa para referirse a tales compuestos y ha de abarcar todos los compuestos que afectan la vía de la

aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada en alguno o todos los puntos en la vía

Preferentemente, el inhibidor de la BCAT es un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, descriptas anteriormente, o un análogo que inhibe la vía de la BCAT o una prodroga de él, o una sal, ester, o amida farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes

A menos que se indique lo contrario, nos adherimos a las siguientes definiciones en toda la invención

"Alquilo" significa un radical de hidrocarburo recto o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono (a menos que se indique lo contrario) e incluye, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, n-hexilo, y similares
"Halógeno" incluye fluor, cloro, bromo y yodo
"Alquenilo" significa radicales de hidrocarburo recto y ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y una unión doble e incluye etenilo, 3-buten-1-ilo, 2-etenilbutilo, 3-hexen-1-ilo y similares

"Alquinilo" significa radicales de hidrocarburo recto y ramificado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y una unión

triple e incluye etinilo, 3-butin-1-ilo, propinilo, 2-butin-1-ilo, 3-pentin-1-ilo y similares

"Cicloalquilo" significa un grupo hidrocarbilo monocíclico o policíclico tal como ciclopropilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, ciclobutilo, adamantilo, norpinanilo, decalinilo, norbonilo, ciclohexilo, y ciclopentilo Tales grupos pueden ser sustituidos con grupos tales como hidroxi, ceto y similares También están incluidos los anillos en los cuales 1 a 3 heteroátomos reemplazan carbonos Tales grupos se denominan "heterociclo", que significa un grupo cicloalquilo que también lleva al menos un heteroátomo selecionado de O, S, o NR_2, cuyos ejemplos son oxiranilo, pirrolidinilo, piperidilo, tetrahidropirano, piperazinilo, acilpiperazinilo, pirrolidinilo y morfolina, sustituidos o no sustituidos

"Alcoxi" se refiere a los grupos alquilo mencionados anteriormente unidos a través de oxígeno, cuyos ejemplos incluyen metoxi, etoxi, isopropoxi, terc-butoxi y similares Además, alcoxi se refiere a polieteres tales como $-O-(CH_2)_2-O-CH_3$ y similares

Los grupos "alcanoilo" son alquilo unidos a través de un carbonilo, es decir $C_1-C_5-C(O)-$ Tales grupos incluyen formilo, acetilo, pripionilo, butirilo e isobutirilo

699 A23
786

"Acilo" significa un grupo alquilo o arilo (Ar) unido a través de un grupo carbonilo, es decir, R-C(O)- Por ejemplo, acilo incluye un alcanoilo de C_1-C_6, que incluye alcanoilo sustituido, en donde la porción de alquilo puede ser sustituida por NR^4R^5 o un grupo carboxilico o heterociclico Los grupos acilo tipicos incluyen acetilo, benzoilo y similares

Los grupos alquilo, alquenilo, alcoxi, y alquinilo descriptos anteriormente son optativamente sustituidos, preferentemente por 1 a 3 grupos seleccionados de NR^4R^5, fenilo, fenilo sustituido, tio alquilo de C_1-C_6, alcoxi de C_1-C_6, hidroxi, carboxi, alcoxicarbonilo de C_1-C_6, halo, nitrilo, cicloalquilo, y un anillo carbociclico de 5 ó 6 miembros que tiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, nitrógeno sustituido, oxígeno y azufre "Nitrógeno sustituido" significa un nitrógeno que lleva alquilo de C_1-C_6 o $(CH_2)_nPh$ en donde n es 1, 2 ó 3 La sustitución con perhalo y polihalo también está contemplada

Ejemplos de grupos alquilo sustituidos incluyen 2-aminoetilo, pentacloroetilo, trifluorometilo, 2-dietilaminoetilo, 2-dimetilaminopropilo, etoxicarbonilmetilo, 3-fenilbutilo, metanilsulfanilmetilo, metoximetilo, 3-hidroxipentilo, 2-

carboxibutilo, 4-clorobutilo, 3-ciclopropilpropilo, pentafluoroetilo, 3-morfolinopropilo, piperazinilmetilo, y 2-(4-metilpiperazinil)etilo

Ejemplos de grupos alquinilo sustituidos incluyen 2-metoxietinilo, 2-etilsulfaniletinilo, 4-(1-piperazinil)-3-(butinilo), 3-fenil-5-hexinilo, 3-dietilamino-3-butinilo, 4-cloro-3-butinilo, 4-ciclobutil-4-hexenilo, y similares

Los grupos alcoxi sustituidos típicos incluyen aminometoxi, trifluorometoxi, 2-dietilaminoetoxi, 2-etoxicarboniletoxi, 3-hidroxipropoxi, 6-carboxihexiloxi, y similares

Además, los ejemplos de grupos alquilo, alquenilo y alquinilo sustituidos incluyen dimetilaminometilo, carboximetilo, 4-dimetilamino-3-buten-1-ilo, 5-etilmetilamino-3-pentin-1-ilo, 4-morfolinobutilo, 4-tetrahidropirinidilbutilo, 3-imidazolidin-1-ilpropilo, 4-tetrahidrotiazol-3-il-butilo, fenilmetilo, 3-clorofenilmetilo y similares

Los términos "Ar" y "arilo" se refieren a grupos aromáticos no sustituidos y sustituidos Los grupos heteroarilo tienen de 4 a 9 átomos de carbono, de 1 a 4 de los cuales se seleccionan independientemente del grupo formado por O, S y N Los grupos heteroarilo tienen 1 o 2 heteroátomos en un anillo aromático

788

de 5 o 6 miembros Los sistemas de anillos aromáticos mono y bicíclicos están incluidos en la definición de arilo y heteroarilo Los grupos arilo y heteroarilo típicos incluyen fenilo, 3-clorofenilo, 2,6-dibromofenilo, piridilo, 3-metilpiridilo, benzotienilo, 2,4,6-tribromofenilo, 4-etilbenzotienilo, furanilo, 3,4-dietilfuranilo, naftilo, 4,7-dicloronaftilo, pirrol, pirazol, imidazol, tiazol, y similares

Los grupos Ar preferidos son fenilo y fenilo sustituido por 1, 2, o 3 grupos seleccionados independientemente del grupo formado por grupos alquilo, alcoxi, tio, tioalquilo, hidroxi, carbonilo, amino de la fórmula $-NR^4R^5$, y $T(CH_2)_mQR^4$ o $T(CH_2)_mCO_2R^4$ en donde m es de 1 a 6, T es O, S, NR^4, $N(O)R^4$, NR^4R^6Y, o CR^4R^5, Q es O, S, NR^5, $N(O)R^5$, o NR^5R^6Y en donde R^4 y R^5 son los descriptos anteriormente, y R^7 es alquilo o alquilo sustituido, por ejemplo, metilo, tricloroetilo, difenilmetilo, y similares Los grupos alquilo y alcoxi pueden ser sustituidos como se definió anteriormente Por ejemplo, los grupos típicos son carboxialquilo, alcoxicarbonilalquilo, hidroxialquilo, hidroxialcoxi, y alcoxialquilo

El símbolo "-" significa una unión

789

El término "paciente" significa todos los animales incluyendo los humanos Ejemplos de pacientes incluyen humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas y cerdos

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, que incluyen las formas hidratadas En general, las formas solvataladas, que incluyen las formas hidratadas, son equivalentes a las formas no solvatadas y han de ser abarcados dentro del alcance de la presente invención

Ciertos compuestos de la presente invención poseen uno o más centros quirales y cada centro puede existir en la configuración R(D) o S(l) La presente invención incluye todas las formas enantioméricas así como las mezclas apropiadas de ellas

Los compuestos de las Fórmulas I, II y III son capaces de formar además analogos farmacéuticamente aceptables que comprenden sales, ésteres, amidas y prodrogas Como se usa en la presente invención, el termino "sales, ésteres, amidas y prodrogas farmacéuticamente aceptables' se refiere a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas y prodrogas de los compuestos de la presente invención que son, a juicio del médico, adecuados para su uso

203 427

790

en contacto con los tejidos de los pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida, y similares, conmensurable con una relación riesgo/beneficio razonable y efectivos para el uso para el cual están destinados, así como las formas zwiteriónicas, cuando son posibles, de los compuestos de la invencion El término "sales" se refiere a las sales de adicion ácidas inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención Estas ales pueden prepararse en el lugar durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o mediante la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y el aislamiento de la sal así formada y que incluye, en forma no taxativa, las sales de adición acidas y/o básicas, solventes, N-óxidos de un compuesto de las Fórmulas I, II y III Esta invención también proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de las Fórmulas I, II o III junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de ellos La totalidad de estas formas están dentro de la presente invención

Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las Fórmulas I, II y III incluyen sales derivadas de ácidos inorganicos tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosforico, sulfurico, bromhídrico, yodhídrico,

fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como los ácidos mono o dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxi alcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc Tales sales entonces incluyen sulfato, pirosulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monhidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencensulfonato, toluensulfonato, fenilacetato, citiato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato, y similares También están contempladas las sales de aminoácidos tales como arginato, gluconato, galacturonato, y similares, ver, por ejemplo, Berge et al, "Sales Farmacéuticas", *J of Pharmaceutical Science*, 1977,66 1-19

Las sales de adición ácidas de los compuestos básicos se preparan poniendo a la forma de base libre en contacto con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal en la forma convencional La forma de base libre puede ser regenerada poniendo a la forma de sal en contacto con una base y aislando a la base libre en la forma convencional Las

706 792 #29

formas de base libre difieren algo de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en solventes polares, pero de lo contrario las sales son equivalentes a su respectiva base libre para los propósitos de la presente invención

Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, o aminas orgánicas Ejemplos de los metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares Los ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína, ver, por ejemplo, Berge et al, mencionado anteriormente

Las sales de adición básicas de compuestos ácidos, se preperan poniendo en contacto la forma ácida libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal en la forma convencional La forma ácida libre puede regenerarse poniendo a la forma de sal en contacto con un ácido y aislando el ácido libre en una forma convencional Las formas ácidas libres difieren algo de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas tales como la solubilidad en solventes polares, pero de lo contrario las sales son equivalentes a sus

206 430
793

respectivo acido libre para los propósitos de la presente invención

Los ejemplos de ésteres no toxicos, farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen los ésteres de alquilo de C_1-C_6 en donde el grupo alquilo es una cadena recta o ramificada Los ésteres aceptables también incluyen los esteres de cicloalquilo de C_1-C_5 así como los ésteres de arilalquilo tales como, en forma no taxativa, bencilo Los ésteres de alquilo de C_1-C_4 son preferidos Los ésteres de los compuestos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales

Los ejemplos de amidas no tóxicas, farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen amidas derivadas de amoniaco, aminas primarias de alquilo de C_1-C_6 y dialquilaminas de C_1-C_6 secundarias en donde los grupos alquilo son cadenas rectas o ramificadas En el caso de las aminas secundarias, la amina también puede estar en la forma de un heterociclo de 5 o 6 miembros que contiene un átomo de nitrógeno Las amidas derivadas de amoniaco, aminas primarias de alquilo de C_1-C_3 y aminas secundarias de dialquilo de C_1-C_2 son preferidas Las amidas de los compuestos de la invención pueden prepararse de acuerdo con métodos convencionales

794

El término "prodroga" se refiere a compuestos que seon transformados rápidamente en vivo para dar el compuesto parental de las Fórmulas precedentes, por ejemplo, por hidrólisis en sangre Se proporciona una discusión completa en T Higuchi y V Stella, "Prodrogas como Sistemas de Suministro Novedosos', Vol 14 de la A C S Symposium Series, y en Portadores Bioreversibles en el Diseño de Drogas, ed Edward B Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambas incorporadas en la presente invención como referencia En general, una prodroga es una droga que ha sido modificada químicamente y puede ser biológicamente inactiva en su lugar de acción, pero que puede ser degradada o modificada por uno o más procesos enzimáticos u otros procesos en vivo hacia la forma bioactiva parental en vivo

Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de un compuesto de las Fórmulas I, II o III, que cuando se administra a un paciente, mejora un síntoma de la enfermedad

El inhibidor de la BCAT, que es preferentemente un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, un análogo que inhibe la vía de la BCAT de las Fórmulas I, II y/o III, una prodroga que inhibe la vía de la BCAT de las Fórmulas I, II y/o III, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los precedentes, puede administrarse de acuerdo con el método de la presente

703 795 A32

invencion mediante cualquier via Las vias de administración adecuadas incluyen la vía sistémica, tal como oral o de inyeccion , tópica, intraocular, periocular (por ejemplo, subTenon's), subconjuntiva, subretinal, supracoroidal y retrobulbar La forma en que se administra el inhibidor de la BCAT depende, en parte, de si el tratamiento de la retinopatia es profiláctico o terapéutico La forma en que se administra el inhibidor de la BCAT para el tratamiento terapéutico de la retinopatía depende, en parte, de la causa de la retinopatia

Por ejemplo, dado que la diabetes es la principal causa de la retinopatía, el inhibidor de la BCAT puede administrarse profilácticamente tan pronto como se detecta el estado de retinopatia prediabética Para el tratamiento profiláctico de la retinopatía que puede derivar de la diabetes, el inhibidor de la BCAT preferentemente se administra en forma sistémica, por ejemplo, por vía oral o de inyección Para el tratamiento terapéutico de la retinopatía diabética no proliferativa, el inhibidor de la BCAT puede administrarse en forma sistémica, por ejemplo por vía oral o de inyección, o intraocular La retinopatía diabética proliferativa puede ser tratada terapéuticamente mediante la administracion del inhibidor de la BCAT por vía intraocular, tópica, subconjuntiva o periocular (por ejemplo subTen's), por ejemplo Preferentemente, el inhibidor de la BCAT se administra por

209 435
796

vía intraocular, tópica, subconjuntiva o periocular (por ejemplo, subTenon's) para el tratamiento profiláctivo, o terapeutico de la retinopatia, antes, durante o después de la extracción quirúrgica de un tejido cicatrizado de un ojo, generado durante la neovascularización durante la etapa diabética proliferativa

El inhibidor de la BCAT preferentemente se administra tan pronto como es posible después de que se ha determinado que un animal, tal como un mamífero, específicamente un humano, está en riesgo de retinopatía (tratamiento profiláctico) o ha comenzado a desarrollar retinopatía (tratamiento terapéutico) El tratamiento depende, en parte, del inhibidor de la BCAT particular que se use, de la cantidad del inhibidor de la BCAT administrada, de la vía de administración, y de la causa y medida, si hubiera, de la retinopatía desarrollada

Un conocedor del arte apreciará que los métodos adecuados para administrar un inhibidor de la BCAT, que es útil en el método de la presente invención, están disponibles Aunque se puede utilizar más de una vía para administrar un inhibidor de la BCAT particúlar, una via particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía Por consiguiente las vías de administración descriptas son simplemente ejemplos y no son de ningún modo taxativas

434
797

La dosis administrada a un animal, particularmente un humano, de acuerdo con la presente invención, debe ser suficiente para producir la respuesta deseada en el animal en un marco de tiempo razonable Un experto en el arte reconocerá que la dosificación depende de una variedad de factores, que incluyen la resistencia del inhibidor de la BCAT particular empleado, la edad, la especie, la condición y el estado de la enfermedad, y el peso corporal del animal, así como la cantidad de la retina que está a punto de ser afectada o que está afectada realmente por la retinopatia El tamaño de la dosis también será determinado por la via, el ritmo y la frecuencia de la administración así como la existencia, naturaleza y nivel de cualquier efecto colateral adverso que pueda acompañar a la administración de un inhibidor de la BCAT particular y el efecto fisiológico deseado Un experto en el arte apreciará que diversas condiciones o estados de enfermedad, en particular, condiciones o estados de enfermedad crónicos, pueden requerir un tratamiento prolongado que consiste en multiples administraciones

Las dosis y los regímenes de dosificacion pueden ser determinados por técnicas convencionales que hallan la gama conocidas para los expertos en el arte En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son

241 798 435

inferiores a la dosis optima del compuesto Luego, la dosificación es aumentada en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo segun las circunstancias El método de la presente invención típicamente consiste en la administracion de 1 mg/kg/dia a 100 mg/kg/dia, preferentemente de 15 mg/kg/día a 50 mg/kg/dia , si se administra en forma sistémica La administracion intraocular típicamente consiste en la administración de 0,1 mg a 5 mg en total, preferentemente de 0,5 mg en total a 1 mg en total Una concentracion preferida para la administración tópica es de 100 mu M

Las composiciones para su uso en el método de la presente invención preferentemente comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de un inhibidor de la BCAT suficiente para tratar la retinopatía en forma profiláctica o terapéutica El portador puede ser cualquiera de aquellos que se usan convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones fisicoquímicas, tales como la solubilidad y la falta de reactividad con el compuesto, y por la vía de administración Un conocedor ordinario del arte apreciara que, además de las siguientes composiciones farmacéuticas descriptas, el inhibidor de la BCAT puede formularse como composiciones poliméricas, complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina,

liposomas, microesferas, microcápsulas y similares (ver, por ejemplo, las Patentse Estadounidenses Nos 4 997 652, 5 185 152 y 5 718 922)

El inhibidor de la BCAT puede formularse como una sal de adición farmacéuticamente aceptable Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables para su uso en la cmp farmacéutica incluyen aquellas derivadas de ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, nítrico, y sulfurico, y de los ácidos orgánicos, tales como ácido tartárico, acético, cítrico, málico, láctico, fumárico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, arilsulfónico, por ejemplo, ácido p-toluensulfónico

Los excipientes farmacéuticamente aceptables descriptos en la presente invención, por ejemplo, vehículos, coadyuvantes, portadores o diluyentes, son conocidos para los expertos en el arte y el publico puede conseguirlos fácilmente Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte para el inhibidor de la BCAT y uno que no tenga efectos colaterales perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso

La elección del excipiente será determinada en parte por el inhibidor de la BCAT particular, asi como por el método

particular usado para administrar la composición Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmaceutica de la presente invención Las siguientes formulaciones son simplemente ejemplos y de ninguna manera son taxativas

Las formulaciones inyectables están entre aquellas preferidas de acuerdo con el método de la presente invención Los requerimientos para los portadores farmacéuticamente efectivos para las composiciones inyectables son conocidos por los expertos en el arte (ver Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J B Lippincott Co , Philadelphia, Pa , Banker and Chalmers, eds , páginas 238-250 (1982), y Manual de la ASHP sobre Drogas Inyectables, Toissel, 4ª ed , páginas 622-630 (1986)) Se prefiere que tales composiciones inyectables se administren por vía intramuscular, intravenosa o intraperitoneal

Las formulaciones tópicas son conocidas para los expertos en el arte Tales formulaciones son adecuadas en el contexto de la presente invención para la aplicación a la piel El uso de parches, protectores corneales (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 185 152) y de soluciones oftálmicas (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 7210 182) y de ungüentos, por ejemplo, gotas oculares, está también dentro de la pericia del arte

Las formulaciones adecuadas para la administración oral comprenden (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina, o jugo de naranja, (b) cápsulas, tabletas, grageas, que contienen cada una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos, (c) polvos, (d) suspensiones en un líquido apropiado, y (e) emulsiones adecuadas Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin el agregado de un agente tensoactivo, agente de suspensión, o agente emulsionador farmacéuticamente aceptable Las formas de cápsulas pueden ser del tipo ordinario de gelatina con recubrimiento duro o blando que contienen, por ejemplo, agentes tensoactivos, lubricantes, rellenos inertes, tales como lactosa, sucrosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz Las formas de tabletas pueden incluir uno o más de lactosa, sucrosa, manitol, almidon de maíz, almidón de papa, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, sodio de croscomelosa, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido estárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampones, agentes desintegrantes, agentes humectantes,

215 439
802

conservantes, agentes saborizantes, y excipientes farmacéuticamente compatibles Las formas de grageas pueden comprender el ingrediente activo en un sabor, generalmente sucrosa y acacia o tragacanto así como pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sucrosa y acacia, emulsiones, geles, y similares que contienen, además del ingrediente activo, aquellos excipientes que con conocidos en el arte

La efectividad de una droga administrada oralmente depende del transporte eficinete de la droga a través del epitelio de la mucosa y de su estabilidad en la circulación enterohepática Las drogas que son efectivas después de la administración parenteral pero menos efectivas por la via oral, o cuya semivida en el plasma se considera demasiado corta, pueden ser químicamente modificadas en una forma de prodroga

La formulación adecuada para la administración parenteral incluye soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor al cual está destinada, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y conservantes El inhibidor puede

216 803 440

administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un liquido estéril o una mezcla de liquidos, que incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azucares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol, o alcohol hexadecilico, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, sulfóxido de dimetilo, cetales de glicerol, tales como 2,2,-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, tales como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster o glicérido de ácido graso, o un glicérido de ácido graso acetilado, con o sin el agregado de un agente tensoactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionadores y otros coadyuvantes farmaceuticos Los aceites, que pueden usarse en formulaciones parenterales incluyen petróleo, aceites animales, vegetales o sintéticas Ejemplos especificos de aceites incluyen aceite de mani, de soja, de sésamo, de semilla de algodón, de maiz, de oliva, de petrolato y mineral

Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de acidos grasos

777 804 442

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio, y trietanolamonio, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, y haluros de alquil piperidinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasos, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno polioxipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-p-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de ellos

Las formulaciones parenterales típicamente contienen un 0,5% a 25% en peso del ingrediente activo en solución Se pueden usar conservantes y tampones Para minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la infección, tales composiciones pueden contener uno o más agentes tensoactivos no iónicos que tienen un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de 12 a 17

La cantidad del agente tensoactivo en tales formulaciones típicamente está en la gama del 5% al 15% en peso Los agentes

718 805 442

tensoactivos adecuados incluyen los ésteres de ácido graso de polietilen sorbitan, tales como monooleato de sorbitan y los agregados de peso molecular alto de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol Las formulaciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y tubos, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente el agregado del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para las inyecciones, inmediatamente antes del uso Las soluciones y suspensiones para inyecciones extemporaneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles de la clase descripta anteriormente

Tales composiciones pueden formularse como formulaciones intraoculares, formulaciones de liberación sostenida o dispositivos (ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense No 5 378 475) Por ejemplo, se puede usar gelatina, sulfato de condroitina, un polifosfoéster, tal como bis-2-hidroxietil-tereftalato (BHET), o un ácido polilláctico-glicólico (en diversas proporciones), para formular formulaciones de liberación sostenida Los implantes (ver, por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos 5 443 505 5 853 224 y 4 997 652), dispositivos (ver, por ejemplo, las Patentes

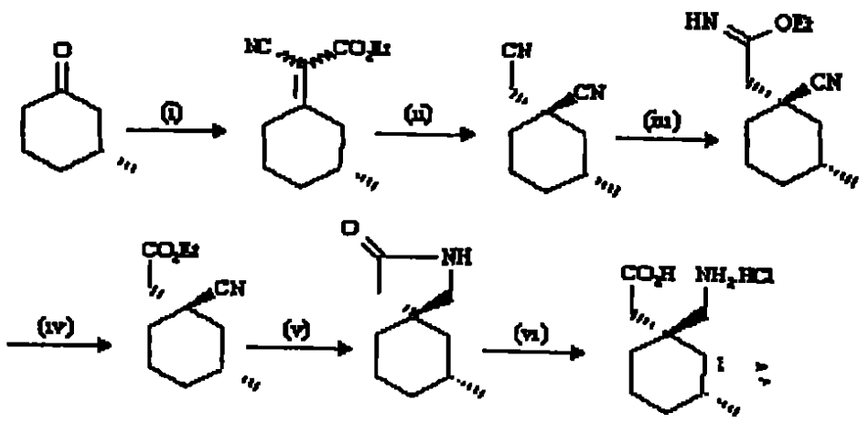
919
806

Estadounidenses Nos 5 554 187, 4 863 457, 5 098 443 y 5 725 493), tales como un dispositivo implantable, por ejemplo, un depósito mecánico, un dispositivo intraocular o un dispositivo extraocular con un conducto intraocular (por ejemplo, de 100 mu a 1 mm de diámetro), o un implante o un dispositivo compuesto por una composicion polimérica como las descriptas anteriormente

El método de la presente invención puede también consistir en la co-administración de otros compuestos farmacéuticamente activos Por "co-administración" se entiende la administración antes, simultáneamente con, por ejemplo en combinación con el inhibidor de la BCAT en la misma formulación o en formulaciones separadas, o después de la administración de un inhibidor de la BCAT como los descriptos anteriormente Por ejemplo, los corticosteroides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, dexametasona, o triamcinalona acetinida, o compuestos antiinflamatorios que no continen corticosteroides, tales como ibuprofeno o flubiprobeno, pueden ser así co-administrados En forma similar, las vitaminas y minerales, por ejemplo, zinc, antioxidantes, por ejemplo carotenoides (tales como zeaxantina o luteina) y los micronutrientes pueden ser co-administrados

Esquemas sintéticos generales para preparar compuestos de las Fórmulas I-IV

EJEMPLO 1 Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-aminometil-3-metil-ciclohexil)-acetico



(i) EtO_2CCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Tolueno, 120°C

(ii) a NaCN, EtH (95%), H_2O, 115°C, b HCl(g)

(iii) EtOH, HCl(g), Tolueno

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2, $EtOH/NH_3$, Ni Raney, 30°C-35°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Paso i Etil éster del ácido 2-ciano-((R)-3-metil-ciclohexilideno)-acético

Una mezcla de 3-(R)-metilciclohexanona (125 mmol), cianoacetato de etilo (124 mmol), acetato de amonio (12,5 mmol) y ácido acético glacial (24 mmol) se refluyeron con una trampa de Dean Stark durante 24 horas La mezcla se enfrió y se lavó con H_2O Los lavados con H_2O se extrajeron con tolueno Los extractos de tolueno se combinaron con la capa orgánica original, se secaron sobre $MgSO_4$ y se evaporaron con un solvente El aceite crudo se purificó mediante destilación de Kugelrohr para dar un aceite (Temperatura del horno de punto de ebullicion 150°C-160°C) Rendimiento del 86%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,01-1,05 (3H, m), 1,17-1,32 (1H, m), 1,35 (3H, t, J=7 Hz), 1,42-2,30 (6H, m), 2,98 (1H, d, J=13 Hz), 3,74 (1H, d, J=13 Hz), 4,27 (2H, q, J=7 Hz)

MS (CI) m/z 208 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{17}NO_2$ Calculado C 69,54 H 8,27 N 6,76

Hallado C 69,44 H 8,22 N 6,76

Paso ii trans-(1R,3R)-1-Cianometil-3-metil-ciclohexanocarbonitrilo

A una solución de NaCN (40 mmol) en 6 ml de H_2 y 160 ml de etanol (95%), se agregó etil éster del ácido 2-ciano((R)-3-metil-cicloehxilideno)-acético (40 mmol) Pasadas 22 horas en reflujo la solución enfriada se filtró, el filtrado se acidificó con HCl gaseoso y se filtró nuevamente El solvente

446
799 809

y el aceite crudo se purificó mediante cromatografía de columna para dar un sólido cristalino de color amarillo pálido Rendimiento del 88%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,90 (1H, m), 0,98 (3H, d, J=6 Hz), 1,11 (1H, t, J=12 Hz), 1,38 (1H, dt, J=4, 9 Hz), 1,60-1,90 (4H, m), 2,07 (2H, m), 2,68 (2H, s)

MS (CI) m/z 163 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{14}N_2$ Calculado C 74,04 H 8,70 N 17,27

Hallado C 69,44 H 8,71 N 17,25

Paso iii Etil éster del ácido trans-2-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acetimídico

A una solución de trans-(1R,3R)-1-cianometil-3-metil-ciclohexanocarbonitrilo (6,2 mmol) en 30 ml, etanol (absoluto) se agregaron 30 ml de tolueno seco La solución se enfrió en hielo mientras se la saturaba con HCl gaseoso La solución detenida fue dejada en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas El solvente se removió y el residuo sólido se trituró con dietil éter para obtener un precipitado que se secó para dar un sólido cristalino Rendimiento 50%

Punto de fusión 118°C-120°C

447 729 810

^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 0,8-0,89 (1H, m), 0,91 (3H, d, J=6,3 Hz), 1,06-1,12 (1H, m), 1,24-1,35 (1H, m), 1,37 (3H, t, J=7 Hz), 1,41-1,95 (6H, m), 3,02 (2H, s), 4,19 (2H, q, J=7 Hz)

MS (CI) m/z 195 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1,08M HCl Calculado C 58,19 H 8,58 N 11,31

Hallado 58,25 H 8,59 N 11,59

Paso iv Etil éster del acido trans-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acético

Etil éster del ácido trans-2-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acetimidico (1,1 mmol) se disolvió en H_2O helada (40 ml) y el pH se ajustó con HCl 1 N a pH 1,5 La solución se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas Se agregó acetato de etilo (30 ml) y la capa orgánica se lavó con H_2O, se secó y el solvente se removió para dejar un aceite claro Rendimiento 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,78-0,90 (1H, m), 0,93 (3H, d, J=6 Hz), 0,97-1,0 (1H, m), 1,23-1,25 (1H, m), 1,29 (3H, t, 7,2 Hz), 1,57-1,80 (4H, m), 2,05-2,08 (2H, Br t), 2,54 (2H, s), 4,20 (2H, q, J=7,2 Hz)

MS (CI) m/z 210 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{19}NO_2$ Calculado C 68,87 H 9,15 N 6,69

Hallado C 68,87 H 9,11 N 6,90

724 811 448

Paso v trans-(5R,7R)-7-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona

Etil éster del ácido trans-((1R,3R)-1-ciano-3-metil-ciclohexil)-acético (8,9 mmol) se disolvió en NH_3/EtOH (7%, 40 ml) junto con Níquel Raney prelavado (con H_2O seguida por EtOH) en un matraz de Parr de 250 ml La solucion se hidrogenó a 30°C, 46 psi durante 24 horas La solución enfriada se filtró a través de un tapón de celita, lavando acetato de etilo El solvente se removió del filtrado para dejar un sólido blanco Rendimiento 30%

Punto de fusión 92°C-98°C

^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 0,75-0,82 (1H, m), 0,84 (3H, d, J=6,4 Hz), 0,88-0,94 (1H, m), 1,14-1,19 (1H, m), 1,20-1,50 (2H, m), 1,50-1,63 (4H, m), 1,91 (2H, s), 3,03 (2H, s), 7,42 (1H, s)

MS (CI) m/z 168 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{17}NO$ Calculado C 71,81 H 10,25 N 8,37

Hallado C 71,80 H 10,29 N 8,31

Paso vi Clorhidrato del ácido trans-((1R,3R)-1-aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético

trans-(5R,7R)-7-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (2,17 mmol) se disolvió en una solución de HCl a 10 M (5 ml) y H_2O (5 ml) y la mezcla se refluyo a aproximadamente 140°C durante 5 horas La solución enfriada se diluyó con 10 ml de H_2O y 10 ml de DCM

y la capa acuosa se lavo nuevamente con 2x15 ml de DCM La capa acuosa se redujo luego hasta secarse para dejar un sólido blanco Rendimiento 76%

Punto de fusión 148°C-155°C $[\alpha]_D$ = -2,5 (T=20°C, c=1, MeOH)

Un isómero (RR)

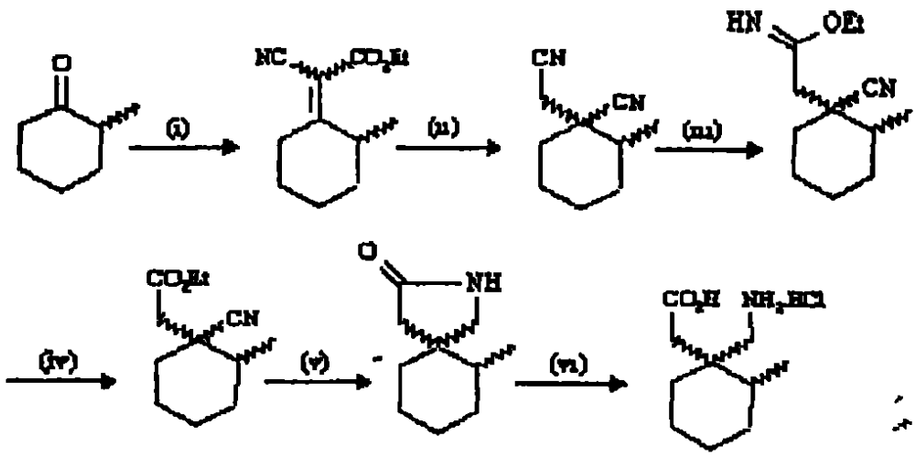
^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,69-0,79 (1H, m), 0,82 (3H, d, J=6 Hz), 0,87-0,90 (1H, m), 1,12-1,20 (1H, dt, J=4,5, 13,3 Hz), 1,34-1,50 (3H, m), 1,60-1,63 (3H, m), 2,30 (2H, s), 3,01 (2H, s), 7,93 (3H, Br s)

MS (CI) m/z 186 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{19}NO_2$ 1,1 HCl Calculado C 53,29 H 8,99 N 6,21

Hallado C 53,23 H 8,99 N 6,45

EJEMPLO 2 Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético



726 813 450

(i) EtO_2OCH_2CN, NH_4Ac, AcOH, Tolueno, 120°C

(ii) a NaCN, EtOH (95%), H_2O, 115°C, b HCl(g)

(iii) EtOH, HCl(g), Tolueno

(iv) HCl, H_2O

(v) H_2, $EtOH/NH_3$, Níquel Raney, 30°C-50°C

(vi) HCl, H_2O, 140°C

Paso i Etil éster del ácido 2-ciano-(2-metil-ciclohexilideno)-acético

(+/-)2-Metil ciclohexanona (80 mmol), etil cianoacetato (80 mmol), acetato de amonio (8 mmol) y ácido acético glacial (16 mmol) reaccionaron como en el método general[1] (Ejemplo 1) paso 1 para dar un aceite claro Rendimiento del 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,23 (3H, dd, J=7, 10 Hz), 1,35 (3H, t, J=7 Hz), 1,55-1,82 (5H, m), 1,93-2,05 (1H, m), 2,17 (1H, dt, J=5, 14 Hz), 2,47 (1H, dt, J= 5, 9 Hz), 2,92-2,97 (1H, Br d, J= 15 Hz), 3,30-3,35 (1H m), 3,81-3,86 (1H, Br d, J=15 Hz), 4,06-4,14 (1H, m), 4,23-4,30 (3H, dq, J= 1, 6 Hz)

MS (CI) m/z 208 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{17}NO_2$ Calculado C 69,54 H 8,27 N 6,76

Hallado C 69,26 H 8,26 N 6,66

Paso ii 1-Cianometil-2-metil-ciclohexanocarbonitrilo

727 859 814

Etil éster del ácido 2-ciano-(2-metil-ciclohexilideno)-acético (37 mmol), NaCN (37 mmol), reaccionaron como en el método general (Ejemplo 1), paso ii El sólido crudo se purificó mediante cromatografía de columna (3 1, heptano acetato de etilo), para dar un aceite claro Rendimeinto 76%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,06 (3H, d, J=6,8 Hz), 1,11 (1H, d, J=6,8 Hz), 1,20-2,20 (18H, m), 2,77 (2H, dd, J=16,8 Hz), 2,63 (2H, dd, J=16,8 Hz)

MS (CI) m/z 163 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{14}N_2$ Calculado C 73,49 H 8,69 N 16,86

Hallado C 73,24 H 8,73 N 17,08

Paso iii Etil éster del ácido 2-(1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acetimídico

1-Cianometil-2-metil-ciclohexanocarbonitrilo (7,3 mmol) reaccionó como en el metodo general (Ejemplo 1), Paso iii para dar un sólido blanco Rendimiento 70%

Punto de fusión 107°C-114°C

^{1}HNMR (DMSO) 400 MHz δ 1,00-1,06 (3H, 2xt, J=6,4 Hz), 1,10-1,38 (2H, m), 1,38 (3H, t, J=6,8 Hz), 1,40-2,10 (7H, m), 2,86, 2,92, 3,10, 3,28 (2H, 4xd, J=14, 14,4 Hz resp), 4,48 (2H, q, J=6,8 Hz)

MS (CI) m/z 209 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{20}N_2O$ 1,06 HCl Calculado C 58,37 H 8,60 N 11,347

Hallado C 58,15 H 8,63 N 11,60

Paso iv Etil éster del ácido (1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acético

Etil éster del ácido 2-(1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acetimídico (4,1 mmol) reaccionó como en el método general (Ejemplo 1) paso (iv) para dar un aceite claro Rendimiento 82%

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 1,03, 1,090 (3H, 2xd, J=7 Hz), 1,27-1,30 (3H, m), 1,32-2,00 (8H, m), 2,10-2,20 (1H, m), 2,44, 2,82 (3H, 2xd, J=14,8 Hz), 2,54 (1H, m), 4,16-4,22 (2H, m)

MS (CI) m/z 210 (MH^+)

Análisis $C_{12}H_{19}NO_2$ Calculado C 68,87 H 9,15 N 6,69

Hallado C 68,84 H 9,13 N 6,75

Paso v 6-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona

Etil éster del ácido (1-ciano-2-metil-ciclohexil)-acético (8,4 mmol) reaccionó como en el metodo general (Ejemplo 1) Paso (v) durante 24 horas a 10°C, 50 psi El aceite crudo se purificó mediante cromatografía de columna (acetato de etilo), para dar un sólido blanco Rendimiento 34%

Punto de fusión 85°C-90°C

729 453
816

^{1}HNMR ($CDCl_3$) 400 MHz δ 0,88-0,91 (3H, dd, J=6,8 Hz), 1,41-1,78 (9H, m), 2,00-2,30 (2H, m), 3,06-3,23 (2H, m), 7,07 (1H, Br, s)

MS (CI) m/z 168 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{17}NO$ Calculado C 71,81 H 10,24 N 8,37

Hallado C 71,83 H 10,19 N 8,27

Paso vi Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético

6-Metil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (2,5 mmol) reaccionó como en el método general (Ejemplo 1) paso vi para dar un sólido blanco Rendimiento 42%

Punto de fusión 108°C-110°C

$[\alpha]_D$= 0(T=20,5°C, C=1, MeOH) Dos diastereómeros 3 1

^{1}HNMR (DMSO = D_2O) 400 MHz δ 0,79, 0,85 (3H, 2xd, J=6,8 Hz), 1,21-1,65 (9H, m), 2,22, 2,43 (1H, 2xd, J=15 Hz), 2,46, 2,49 (1H, 2xd, J=15 Hz), 2,83-2,92 (1H, 2xd, J=3,6 Hz), 3,05, 3,15 (1H, 2xd, J=13,6 Hz)

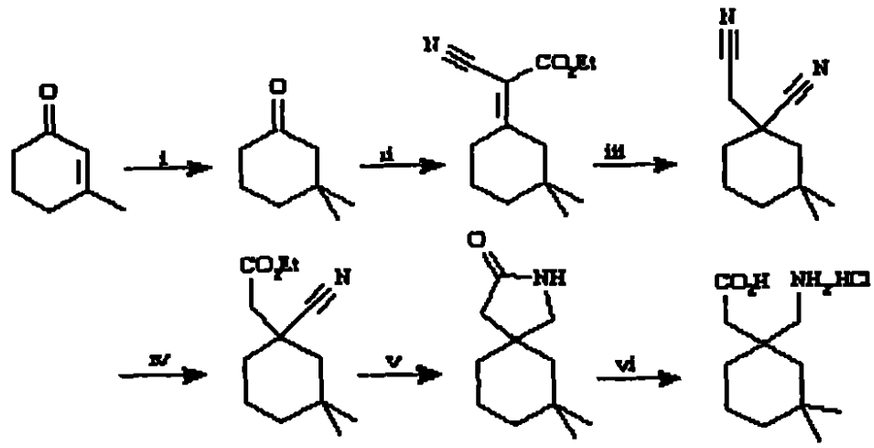
MS (CI) m/z 186 (MH^+)

Análisis $C_{10}H_{19}NO_2$1,3HCl Calculado C 51,64 H 8,79 N 6,02

Hallado C 51,66 H 8,91 N 16,16

730 454
817

EJEMPLO 3 Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acetico



i) CuI, MeLi, NH_4Cl, NH_3 (92%)

ii) $NCCH_2CO_2Et$, NH_4OAc, tolueno (83%)

iii) NaCN, EtOH, H_2O (57%)

iv) HCl, EtOH, tolueno (93%)

v) H_2, Ni Raney, EtOH NH_3 (84%)

vi) HCl, H_2O (64%)

Paso i 3,3-Dimetil-ciclohexanona

Sintetizada a través del metodo descripto por Pelletier, S W , Mody, N V , *J Org Chem* , 1976, 41, 1069

737 455
818

Una solución de dimetil cuprato de litio se preparó agregando metil litio (1,4 M en éter /7,25 ml, 2,45 mol) a yodúro de cobre (I) (8,8 g, 0,046 mol) bajo argón La solución se enfrió a 0°C, y se agregó 3-metil-ciclohexen-1-ona (5 ml, 0,044 mol) gota a gota, con agitación, y se formó un precipitado de color amarillo profundo La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante una hora antes de ser vertida en una solución de amoníaco acuoso (100 ml) y acetato de amonio (ca 5 g) Las capas se separaron y la capa acuosa se lavó con éter dietílico (3 x 50 ml) Los orgánicos combinados se lavaron con solución salina saturada (3 x 100 ml), se secaron ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío para dejar un líquido de color amarillo oscuro

^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,98 (6H, s), 1,59 (2H, m), 1,88 (2H, m), 2,14 (2H, m), 2,26 (2H, m)
IR (película) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 2956, 1711 (C=O), 1457, 1368, 1292, 1226, 1076

Paso ii Etil éster del ácido 2-ciano-5,5-dimetil-3-propil-hex-2-enoico

A una solución de 3,3-dimetilciclohexanona (4 g, 0,032 mol) en tolueno (25 ml), se agregó cianoacetato de etilo (3,37 ml, 0,032 mol, 1 eq), acetato de amonio (0,24 g, 0,003 mol, 0,1

737 819 456

eq), y ácido acético (0,36 ml, 0,006 mol, 0,2 eq) La solución de color amarillo se calentó a reflujo mientras se la unía a una trampa de Dean-Stark, y se continuó calentando hasta que ya no hubo agua condensada en la trampa Después d enfriar, la solución de color naranja se lavó con agua (3 x 25 ml) y la capa orgánica se secó ($MgSO_4$) La filtración y la remoción del solvente en vacio dieron el producto crudo como un líquido de color naranja profundo La purificación se logró mediante destilacion de Kugelrohr para dejar la mezcla de productos *cis* y *trans* como un líquido de color amarillo pálido, punto de ebullición 160°C-170°C, 4 mbar (5,83 g, 83%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,96, (6H, s, 2x Me), 1,34 (6H, m, 2x Me de éster), 1,49 (4H, m), 1,75 (2H, quin , J 6,4), 2,46 (2H, s), 2,60 (2H, t, J = 6,4 Hz), 2,80 (2H, s), 2,93 (2H, t, J=6,4 Hz), 4,27 (4H, m)

MS (CI) z/e 222 (M^++1)

IR (película) $\nu_{MAX}cm^{-1}$ 2958, 2870, 2224 (CN), 1731 (C=O), 1606 (C=C), 1277, 1223

Análisis $C_{13}H_{19}O_2N$ Calculado C 70,56 H 8,65 N 6,32

Hallado C 70,35 H 8,79 N 6,25

Paso iii 1-Cianometil-3,3-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo

733
820
457

A una solución del etil éster del ácido 2-ciano-5,5-dimetil-3-propil-hex-2-enoico (1,26 g, 0,006 mol) en etanol (100 ml) y agua (4 ml) se agregó cianuro de sodio (0,28 g, 0,006 mol, 1 eq) La solución amarillenta se calentó a reflujo durante 8 horas y luego se enfrió, durante cuyo tiempo se formó un precipitado blancuzco

La suspensión se filtró bajo vacío y el filtrado se acidificó con gas de HCl hasta que el pH fue de aproximadamente 2 La mezcla luego se filtró una segunda vez y luego el solvente se removió en vacío para dejar el producto crudo como un sólido de color verde pálido

La cromatografía de columna rapida, después de la adsorción del producto crudo sobre silice, eluyendo con 30%-50% de EtOAc en heptano, dio el binitrilo como un sólido incoloro (0,57 g, 57%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,99, (3H, s, Me), 1,13 (1H, td, J 13,2, 4,2), 1,21 (3H, s, Me), 1,32 (2H, m), 1,54 (1H, m), 1,82 (3H, m), 2,15 (1H, m), 2,65 (2H, s, CH_2CN)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 19,61, 25,17, 30,79, 31,18, 33,77 34,79, 35,37, 37,92, 46,26, 115,06, 122,19

MS (CI) z/e 177 (M^++1)

IR (pelicula) ν_{max} cm^{-1} 2988, 2937, 2237 (2x CN), 1749, 1456, 1423, 1369, 1202, 1180, 1031, 972

Análisis $C_{11}H_{16}N_2$ Calculado C 74,96 H 9,15 N 15,89

Hallado C 75,08 H 9,32 N 15,80

458
734
821

Paso iv, Etil ester del ácido (1-ciano-3,3-dimetil-ciclohexil)-acetico

1-Cianometil-3,3-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (0,50 g, 2,84 mmol) se disolvio en etanol absoluto (20 ml) a temperatura ambiente y luego se enfrió a 0°C Se agregó tolueno (20 ml) a la solución y luego la mezcla de la reaccion se acidificó pasando gas de HCl a través de ella a una velocidad suave durante ca 45 minutos El matraz fue detenido luego y se lo dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas

La solución de color amarillo fue dividida entre el acetato de etilo y el agua y las capas se separaron La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x 30 ml) y los orgánicos combinados se lavaron con una solución de carbonato de hidrógeno de sodio saturado acuoso (3x 50 ml), solución salina (3x 50 ml), se secaron ($MgSO_4$) y el solvente se removio bajo presión reducida para dejar un líquido de color amarillo pálido (0,59 g, 93%)

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,94, (3H, s, Me), 1,16 (3H, m), 1,21 (3H, s, Me), 1,29 (3H, t, J 7,2, CH_2CH_3), 1,50 (1H, m), 1,65 (1H, dt, J 14,4, 7,6), 1,84 (1H, qt, J 13,3, 3,2), 1,96 (1H, dt, J 13,7, 2,2), 2,16 (1H, m), 2,48 (1H, d, J 15,6, C-2H), 2,54 (1H, d, J 15,6, C-2H), 4,20 (2H, q, J 7,2, CH_2CH_3)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 14,21, 19,65, 25,42, 31,03, 34,04, 34,14, 36,08, 38,44, 46,14, 46,80, 61,02, 123,67, 169,00

MS (CI) z/e 224 (M^++1)

235 822

IR (película) $\nu_{máx}$ cm^{-1} 2998, 2937, 2868, 2234 (C=O), 1457, 1372, 1217, 1181, 1154, 1026

Análisis $C_{13}H_{21}NO_2$ Calculado C 69,92 H 9,48 N 6,27

Hallado C 69,63 H 9,45 N 6,15

Paso v 7,7-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona,

Etil éster del ácido (1-ciano-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético (0,5 g, 2,23 mmol) se hidrogenó en amoníaco etanólico (60 ml) con níquel Raney como catalizador (ca 0,25 g) a 50°C y 50 psi durante 48 horas

El catalizador luego fue removido por filtración a través de Celita, y el solvente fue removido en vacío para dejar un sólido cristalino de color verdoso

La cromatografía de columna rápida, eluyendo con 0%-100% de acetato de etilo en heptano, dio la lactama pura como un sólido incoloro (340 mg, 84%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0,89, (3H, s, Me), 0,92 (3H, s, Me), 1,25 (2H, m), 1,36 (2H, m), 1,51 (3H, m), 1,68 (1H, s), 2,18 (1H, d, J 16,4, CH_2NH), 2,24 (1H, d, J 16,8, CH_2NH), 3,15 (2H, s, CH_2CO)

^{13}C NMR (400 MHZ, $CDCl_3$) 19,16, 29,88, 30,36, 31,28, 36,57, 39,05, 39,61, 44,58, 49,54, 54,79, 17,72

MS (CI) z/e 182 (M^++1)

936
823

IR (película) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 3203, 3100 (NH), 2914, 2860, 1698 (C=O), 1486, 1374, 1317, 1289, 1257, 1076

Análisis $C_{11}H_{19}NO$ Calculado C 72,88 H 10,56 N 7,73

Hallado C 72,38 H 10,47 N 6,7,56

Paso vi Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético

7,7-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (0,3 g, 1,66 mmol) se disolvió en una mezcla de HCl (concentrado, 5 ml) y agua (5 ml), y la solución incolora resultante se calentó a reflujo durante 20 horas La solución se enfrió y luego fue dividida entre agua y diclorometano y las capas separaron La capa acuosa se lavó con diclorometano (3x 20 ml) y el agua/HCl se removió mediante evaporación rotativa para dejar el producto crudo como un sólido blancuzco La trituración de este sólido con acetato de etilo y la filtración del producto dio la sal de clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético como un sólido incoloro (140 mg, 42%, 64% basado en el material inicial recuperado)

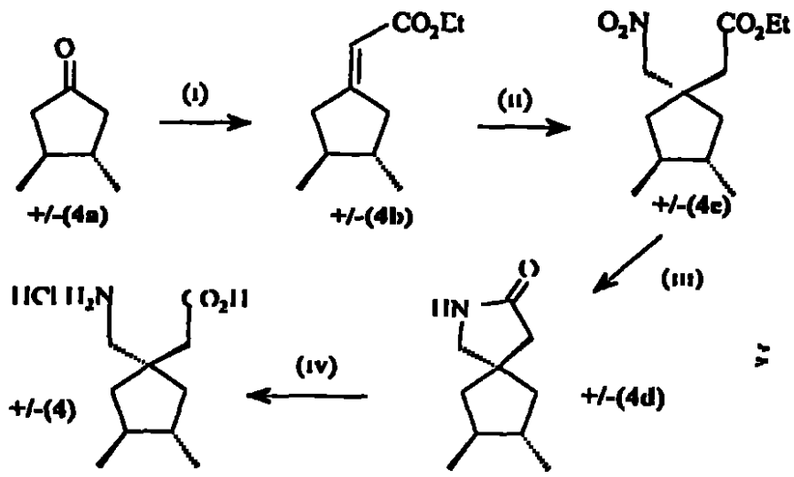
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) 0,90, (3H, s, Me), 0,92 (3H, s, Me), 1,15-1,49 (8H, m), 2,45 (2H, s, CH_2CO_3H), 2,90 (2H, br q, J 13,5, CH_2NH_3), 7,96 (3H, br s, NH_3), 12,36 (1H, br s, OH)

IR (película) $\nu_{máx}cm^{-1}$ 2930, 1728 (C=O), 1272, 1123

Análisis $C_{11}H_{22}NO_2Cl$ Calculado C 56,04 H 9,41 N 5,94

Hallado C 55,79 H 9,61 N 6,23

EJEMPLO 4 Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso 1 Síntesis del Etil éster del ácido (±)(trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (4b)

Se suspendió NaH (dispersión al 60% en aceite, 737 mg, 18,42 mmol), tetrahidrofurano seco (50 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (3,83 ml, 19,30 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Se agregó luego la cetona

737 462
825

(+/-)-(4a) (1,965 g, 17,54 mmol) en THF (10 ml) y se dejó calentar la mezcla a la temperatura ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase orgánica se separo, se lavó con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 1 9) para dar 3,01 g (94%) de (4b) como un aceite incoloro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,01, (3H, d, J=6 Hz), 1,03 (3H, d, J=6 Hz), 1,26 (3H, t, J=7 Hz), 1,49 (2H, m), 2,07 (1H, m), 2,24 (1H, m), 4,13 (2H, q, J= 7 Hz), 5,72 (1H, s)
MS (CI^+) m/e 183 (M+1)

Paso ii Síntesis del Etil ester del acido (±)(trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (4c)

Etil éster del ácido (±)(trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (4b) (2,95 g, 16,2 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (10 ml) y se agitó a 70°C con nitrometano (1,9 ml, 35,2 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en tetrahidrofurano, 22 ml, 22,0 mmol) Pasadas 6 horas, lamezla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl 2N (30 ml) y luego con

739 826 463

solución salina (50 ml) La fase orgánica se recogió, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacio El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (silice, acetato de etilo, heptano 1,9) para dar 1,152 g (29%) de un aceite claro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J=6 Hz), 1,10-1,39 (5H, m), 1,47 (2H, m), 1,87 (1H, m), 2,03 (1H, m), 2,57 (2H, ABq, J = 16,38 Hz), 4,14 (2H, q, J= 7 Hz), 4,61 (2H, ABq, J = 12,60 Hz)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (pelicula) v cm^{-1} 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Paso iii Sintesis de la (±)-(trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 5]nonan-2-ona (4d)

El etil éster del acido (±)-(trans)-(3,4-dimetil-1-nitrilometil-ciclopentil)-acético (4c) (1,14 g, 4,7 mmol) se disolvió en metanol (50 ml) y se agitó sobre catalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrogeno (40 psi) a 30°C Pasadas 5 horas, el catalizador se removió por filtración a través de celita El solvente se removió en vacio para dar 746 mg (95%) de un aceite de color amarillo pálido que se solidificó en reposo

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J=6 Hz), 1,32 (2H, m), 1,46 (2H, m), 1,97 (2H, m), 2,27 (2H, ABq, J = 16,27 Hz), 3,23 (2H, s), 5,62 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 168 (M+1).

IR (película) ν cm^{-1} 1451, 1681, 1715, 2948, 3196

Paso iv, Síntesis del clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético

La (±)-(trans)-7,8-dimetil-espiro[4 4]nonan-2-on (4d) (734 mg, 4,40 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 ml) y se lavó con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recogió y el solvente se removió en vacío El residuo se trituró con acetato de etilo para dar 675 mg (69%) de un sólido blanco después de la recolección y el secado

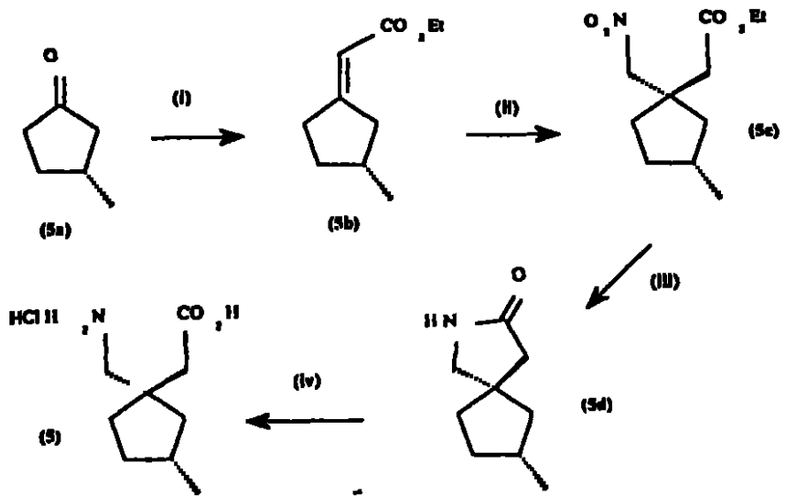
^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J=6 Hz), 1,18 (2H, m), 1,42 (2H, m), 1,72 (1H, m), 2,42 (2H, ABq, J = 16,24 Hz), 2,90 (2H, ABq, J= 12,34 Hz), 12,34 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 186 (M+1 para la base libre)

EJEMPLO 5 Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acetico (5)

741
828

465



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso 1 Síntesis del Etil ester del ácido (R)-(3-metil-ciclopentilideno)-acético

NaH (dispersión al 60% en aceite, 1,86 g, 46,5 mmol) se suspendió en tetrahidrofurano seco (40 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (9,69 ml, 48,8 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Luego se agregó(R)-3-metil-ciclopentanona (5a) (5 ml, 46,5 mmol) en THF (10 ml) y la mezcla fue dejada calentar a la temperatura ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase orgánica se separó, se lavo con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió

242
829

en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 1 9) para dar 5,45 g (70%) de (2) como un aceite incoloro

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,04, (3H, m), 1,27 (3H, t, J= 7 Hz), 1,80-2,74 (7H, m), 2,90-3,15 (1H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,76 (1H, s)

MS (CI^+) m/e 169 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1205, 1371, 1653, 1716, 2955

Paso ii Síntesis del Etil éster del ácido (cis/trans)-(3R)-(3-metil-1-ciclopentil)-acetico (5c)

Etil éster de ácido (R)-(3-metil-ciclopentilideno)-acético (5b) (3,0 g, 17,8 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano (20 ml) y se agitó a 70°C con nitrometano (1,92 ml, 35,6 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en tetrahidrofurano, 25 ml, 25,0 mmol) Pasadas 18 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl 2N (30 ml) y luego con solución salina (50 ml) La fase orgánica se recogió, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 1 9) para dar 2,00 g (49%) de un aceite claro

743 867
830

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,02, (3H, d, J= 6 Hz), 1,08-1,37 (5H, m), 1,59-2,17 (5H, m), 2,69 (2H, m), 4,15 (2H, q, J = 7 Hz), 4,64 (2H, s)

MS (ES^+) m/e 230 (M+1)

IR (película) v cm^{-1} 1183, 1371, 1548, 1732, 2956

Paso iii Síntesis de la (cis/trans)-(7R)-7-Metil-espiro[4 4]nonan-2-ona (5d)

Etil éster del ácido (cis/trans)-(3R)-(3-metil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (5c) (1,98 g, 8,66 mmol) se disuelve en metanol (50 ml) y se agita sobre catalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrógeno (40 psi) a 30°C Pasadas 18 horas, el catalizador se remueve mediante filtración a través de celita El solvente se remueve en vacío y el residuo se purifica mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 1 1) para dar 1,05 g (79%) de un sólido blanco

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 1,03, (3H, m), 1,22 (2H, m), 1,60-2,15 (5H, m), 2,22 (2H, m), 3,20 y 3,27 (2H total, 2 x s, cis y trans), 6,18 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 154 (M+1)

IR (película) v cm^{-1} 1695, 2949, 3231

744 468

831

Paso iv Síntesis del Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético (5)

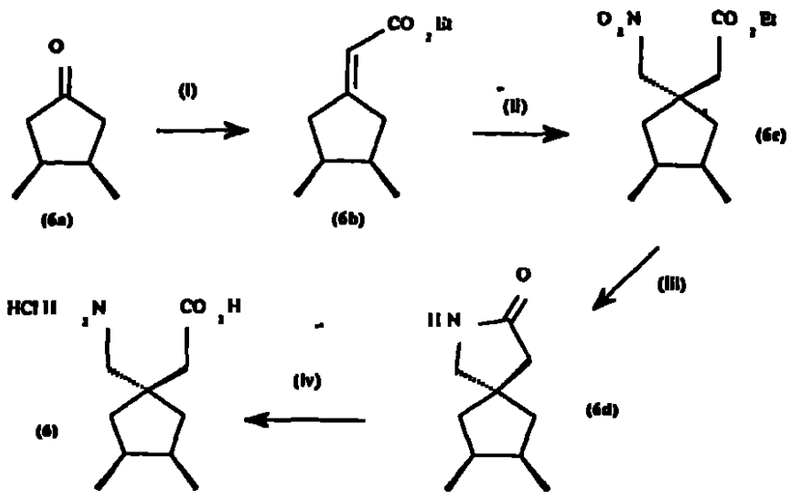
La (cis/trans)-(7R)-7-metil-espiro[4 4]nonan-2-ona (5d) (746 mg, 4,88 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfría a la temperatura ambiente, se diluye con agua (20 ml) y se lava con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recoge y el solvente se remueve en vacío El residuo se tritura con acetato de etilo para dar un sólido blanco que se recoge y se seca Esto se cristaliza desde acetato de etilo/metanol para dar 656 mg (65%) de (5) después de la recolección y el secado

^{1}H NMR 400 MHz, (d_6-DMSO) δ 0,96, (3H, m), 1,01-1,24 (2H, m), 1,42-2,10 (5H, m), 2,41 y 2,44 (2H total, 2 x s, cis/trans), 2,94 (2H, m), 7,96 (3H, br s), 12,35 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 172 (M+1 para la base libre)

745
832

EJEMPLO 6 Clorhidrato del acido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

Paso i Síntesis del Etil éster del acido (cis)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (6b)

NaH (dispersión al 60% en aceite, 519 mg, 12,96 mmol) se suspendió en tetrahidrofurano seco (30 ml) y se enfrió a 0°C Se agregó trietilfosfonoacetato (2,68 ml, 13,5 mmol) y la mezcla se agitó a 0°C durante 15 minutos Luego se agregó (3S,4R)-3,4-dimetil-ciclopentanona (6a) (1,21 g, 10,80 mmol) en THF (10 ml) y la mezcla se dejó calentar a la temperatura

746
833

ambiente Pasadas 2 horas, la mezcla fue dividida entre éter dietílico (200 ml) y agua (150 ml) La fase orgánica se separó, se lavó con solución salina, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rápida (sílice, acetato de etilo heptano 5 95) para dar 1,40 g (71%) de (2) como un aceite incoloro

^1H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,84, (3H, d, J = 6 Hz), 0,91 (3H, d, J= 6 Hz), 1,26 (3H, t, J = 7 Hz), 2,01-2,95 (6H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,76 (1H, s)

MS (CI^+) m/e 183 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1043, 1125, 1200, 1658, 1715, 2959

Paso ii Síntesis del Etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético

Etil éster del ácido (cis)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (6b) (1,384 g, 7,60 mmol) se disolvio en tetrahidrofurano (10 ml) y se agitó a 70°C con nitrometano (0,82 ml, 15,2 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en tetrahidrofurano, 11,4 ml, 11,4 mmol) Pasadas 6 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyo con acetato de etilo (50 ml) y se lavó con HCl a 2N (30 ml) y luego con solución salina (50 ml) La fase orgánica se recogió, se secó ($MgSO_4$) y el solvente se removió en vacío El residuo se purificó mediante cromatografía rapida (sílice,

acetato de etilo heptano 5 95) para dar 0,837 g (45%) de un aceite claro

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J = 6 Hz), 1,21-1,39 (5H, m), 1,98 (2H, m), 2,18 (2H, m), 2,64 (2H s), 4,15 (2H, q, J = 7 Hz), 4,61 (2H, s)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} 1184, 1377, 1548, 1732, 2961

Paso iii Síntesis de la (trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 4]nonan-2-ona (6d)

Etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (6c) (0,83 g, 3,4 mmol) se disolvió en metanol (30 ml) y se agitó sobre catalizador de níquel Raney bajo una atmósfera de hidrógeno (40 psi) a 30°C Pasadas 4 horas, el catalizador se removió mediante filtración a través de celita El solvente se removió en vacío para dar 567 mg (99%) de un aceite de color amarillo pálido que solidificó en reposo

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,91, (6H, d, J = 6 Hz), 1,91 (2H, m), 2,10 (2H, m), 2,32 (2H, s), 3,18 (2H, s), 5,61 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 168 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} , 1304, 1450, 1699, 2871, 3186

248
835

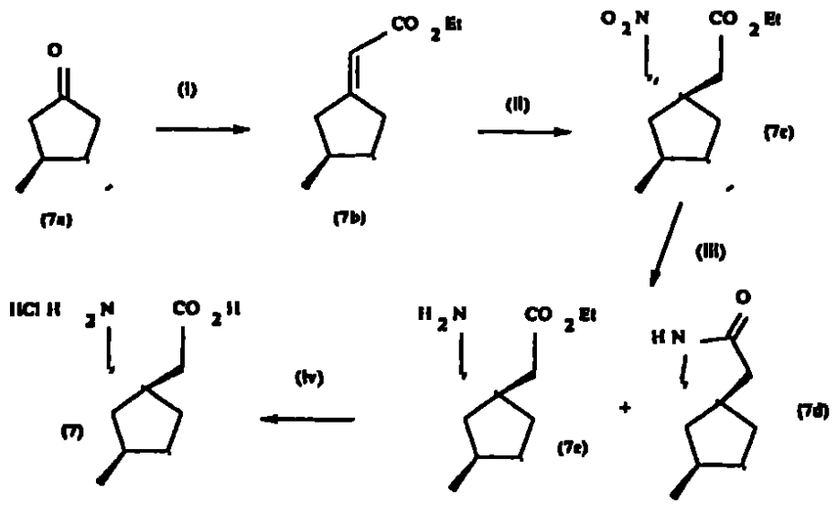
Paso iv Síntesis del Clorhidrato del ácido (trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético (6)

La (trans)-7,8-Dimetil-espiro[4 4]nonan-2-ona (6d) (563 mg, 4,40 mmol) se calentó a reflujo en una mezcla de 1,4-dioxano (5 ml) y HCl a 6N (15 ml) Pasadas 4 horas, la mezcla se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 ml) y se lavó con diclorometano (3 x 30 ml) La fase acuosa se recogió y el solvente se removió en vacío El residuo se trituró con acetato de etilo para dar un sólido blanco que se recogió y se secó Esto se recristalizó desde acetato de etilo/metanol para dar 440 mg (59%) de (6) después de la recolección y el secado

^{1}H NMR 400 MHz, (d_6-DMSO) δ 0,84, (6H, d, J = 6 Hz), 1,21 (2H, m), 1,81 (2H, m), 2,06 (2H, m), 2,47 (2H, s), 2,89 (2H, s), 7,94 (3H, br s), 12,30 (1H, br s)

MS (ES^+) m/e 186 (M+1 para la base libre)

EJEMPLO 7 Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético



Reactivos (i) Trietilfosfonoacetato, NaH, (ii) $MeNO_2$, $Bu_4N^+F^-$, (iii) H_2, Ni, (iv) HCl

La (3S,4S)-3,4-Dimetil-ciclopentanona (7a) es conocida en la bibliografía y puede ser sintetizada mediante los métodos descriptos en ella Y Kato, *Chem Pharm Bull*, 1966,14 1438-1439 y referencias relacionadas W C M C Kokke, F A Varkevisser, J *Org Chem* , 1974,39 1535, R Baker, D C Billington, Iwanaga, H Yamamoto, *Tet Lett* , 1986,27 4507, G Solladie, O Lohse, *Tet Asymm* , 1993,4 1547, A Rosenquist, I Kvarnstrorn, S C T Svensson, B Classon, B Samuelsson, *Acta Chem Scand* , 1992,46 1127, E J Corey, W Su, *Tet Lett* , 1988,29 3423, D W Knight, B Ojhara, *Tet Lett* , 1981,22 5101

Paso a Síntesis del Etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (7b)

A una suspensión de hidruro de sodio (1,3 g, 32,5 mmol) en THF (60 ml) bajo nitrógeno a 0°C, se agregó trietilfosfonoacetato (6,5 ml, 32,7 mmol) durante 5 minutos Después de agitar durante otros 10 minutos, se agregó una solución de (3S,4S)-3,4-dimetil-ciclopentanona (7a) (aproximadamente 2,68 g, 30 mmol) en THF) (2 x 10 ml), a la solución que ahora es clara y se removió el baño de hielo Pasadas 4 hora, se extinguió la reacción vertiendo en agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con éter (400 ml) La fase orgánica se enfrió con solución salina saturada (100 ml), se secó y se concentró en vacío La cromatografía de columna (10 1 heptano/acetato de etilo) dio el producto como un aceite (4,53 g). (aproximadamente 91% de rendimiento)

^{1}H NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ 1,01 (3H, d, J = 6 Hz), 1,03 (3H, d, J = 6 Hz), 1,26 (3H, t, J = 7 Hz), 1,49 (2H, m), 2,07 (1H, m), 2,24 (1 H, m), 2,61 (1H, m), 4,13 (2H, q, J = 7 Hz), 5,72 (1H, s)

MS (CI^+) m/c 183 (M+1)

Paso ii Etil ester del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (7c)

757 838 425

A una solución del etil ester del ácido (trans)-(3,4-dimetil-ciclopentilideno)-acético (7b) (4,24 g 23,3 mmol) en THF (15 ml), se agregó TBAF (32 ml, de una solución a 1 M en THF, 32 mmol) y luego nitrometano (3 ml) y la reacción se calentó a 60°C durante 8 horas Después de enfriar, la mezcla de la reacción se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y se lavó con HCl 2N (40 ml) y luego con solución salina saturada (50 ml) La cromatografía de columna (10 1 heptano/acetato de etilo) dio el producto como un aceite (2,24 g) (40% de rendimiento)

^{1}H NMR 400 MHz, ($CDCl_3$) δ 0,98, (6H, d, J = 6 Hz), 1,10-1,39 (5H, m), 1,47 (2H, m), 1,87 (1H, s), 2,03 (1H, s), 2,57 (2H, ABq, J= 16,38 Hz), 4,14 (2H, q, J= 7 Hz), 4,61 (2H, ABq, J= 12,60 Hz)

MS (ES^+) m/e 244 (M+1)

IR (película) ν cm^{-1} , 1186, 1376, 1549, 1732, 2956

Paso iii Síntesis del Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético (7)

Una solución de etil éster del ácido (trans)-(3,4-dimetil-1-nitrometil-ciclopentil)-acético (7c) (3,5 g, 14,4 mmol) en metanol (100 ml) en la presencia de una esponja de Ni se hidrogenó a 30°C y a 50 psi durante 4 horas El filtrado del catalizador y la concentración en vacio dio una mezcla de 2 1 de lactama y aminoéster, 2,53 g, calculado como 96%, que se

752 426
839

usó sin purificación Esta mezcla (2,53 g, 13,8 mmol) en dioxano (15 ml) y HCl a 6N (45 ml) se calentó bajo reflujo (baño de aceite = 110°C) durante 24horas Después de enfriar y diluir con agua (60 ml), la mezcla se lavó con diclorometano (3 x 50 ml) y luego se concentró en vacío El aceite resultante se lavó con acetato de etilo y luego con diclorometano para dar una espuma pegajosa que se secó para dar el producto como un polvo blanco (2,32 g) (Rendimiento del 76%)

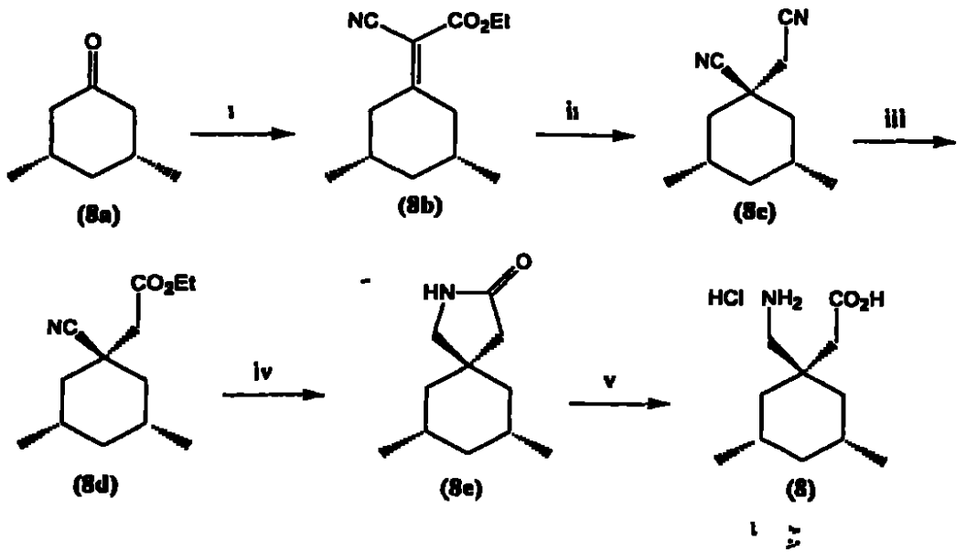
α_D(23°C)(H_2O)(c=1,002)=+28,2°

^{1}H NMR 400 MHz (d_6-DMSO) δ 0,91 (6H, d, J = 6 Hz), 1,18 (2H, m), 1,42 (2H, m), 1,72 (1H, m), 1,87 (1H, m), 2,42 (2H, ABq, J = 16, 24 Hz), 2,90 (2H, ABq, J = 12,.34 Hz), 8,00 (3H, br s), 12,34 (1H, br s)

MS (ES^+) m/c 186 (M+1 para la base libre)

753
840

EJEMPLO 8 Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético



Paso i Síntesis del Etil ester del acido 2-ciano-((3R,5S)-3,5-dimetil-ciclohexilideno)-acético (8b) Cis-3,5-dimetilciclohexanona (8a, 15,78 g, 125,0 mmol) se disolvió en tolueno (150 ml) y se trató con acetato de amonio (0,96 g, 0,099 mmol), ácido acetico (1,4 ml, 0,195 mmol) y etil cianoacetato (14,04 g, 99,2 mmol) La reacción se calentó a reflujo toda la noche con una trampa de Dean-Stark, luego se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con H_2O (3 x 50 ml) La capa acuosa se lavó nuevamente con tolueno (2 x 50 ml) Las capas orgánicas, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de silice

754 A98
841

eluyendo con 5% de EtOAc/hexano para dar 22,0 g (80%) del producto deseado como un aceite claro

MS 222,1 (M+1 para $C_{13}H_{19}N_1O_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,40 (9 1 hexano/EtOAc), Análisis ($C_{13}H_{19}N_1O_2$) (Cal) C 70,56, H 8,68, N 6,33 (hallado) C 70,74, H 8,68, N 6,33 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,83-0,95 (m, 1 H), 1,01 (t, 6 H, J = 6,1 Hz), 1,32 (t, 3 H, J = 7,3 Hz), 1,48-1,85 (m, 5 H), 2,97-3,02 (m, 1 H), 3,92 (dd, 1 H, J = 12,2, 2,2 Hz), 4,24 (q, 2 H, J = 7,1 Hz)

Paso ii Síntesis del 1α,3β,5β-1-Cianometil-3,5-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (8c)

El etil éster del ácido 2-ciano-((3R,5S)-3,5-dimetil-ciclohexilideno)-acético (8b, 6,64 g, 30,0 mmol) se disolvió en EtOH (60 ml) y se agregó a una suspensión de NaCN (1,47 g, 30,0 mmol) en EtOH / H_2O (100 ml / 8 ml) La reacción se calentó a reflujo toda la noche, luego se enfrio a la temperatura ambiente, se filtró y se concentró en vacío para dar un aceite claro que se solificó bajo vacío El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 4 1 hexano/EtOAc para dar 4,05 g (77%) del producto deseado como un sólido pegajoso, blanco

755 479 842

MS no se observó ningun ion de M+1 ($C_{11}H_{16}N_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,31 (4 1 hexano/EtOAc), Análisis ($C_{11}H_{16}N_2$) (Cal) C 74,96, H 9,15, N 15,89 (hallado) C 74,81, H 9,25, N 15,65 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,58 (dd, 1H, J= 24,9, 12,2 Hz), 0,96 (d, 6 H, J = 6,6 Hz), 1,03 (t, 2H, J = 12,9 Hz), 1,75-1,90 (m, 3H), 2,01 (d, 2H, J= 11,5 Hz), 2,65 (s, 2H)

Paso iii Síntesis del Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8d) 1α,3β,5β-1-Cianometil-3,5-dimetil-ciclohexanocarbonitrilo (8c, 5,51 g, 31,26 mmol) se disolvió en EtOH (80 ml) y tolueno (80 ml), se enfrió a 0°C y se saturó con gas de HCl. La solución fue detenida y agitada toda la noche a temperatura ambiente, luego conentrada en vacio para dar el imino éster crudo como un sólido blanco Este material crudo se trituró con Et_2O (150 ml) y se secó bajo vacío, a temperatura ambiente, luego se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml) Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con solución salina, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de silice eluyendo con 6 1 hexano/EtOAc para dar 5,78 g (83%) del producto deseado como un aceite claro

256 843

MS 224,1 (M+1 para $C_{13}H_{21}N_1O_2$), un aceite, TLC SiO_2, R_f 0,32 (6 1 hexano/EtOAc), Análisis ($C_{13}H_{21}N_1O_2$) (Cal) C 69,92, H 9,48, N 6,27 (hallado) C 70,03, H 9,45, N 6,30 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,9, 12,0 Hz), 0,91 (d, 6 H, J = 6,6 Hz), 1,27 (t, 3 H, J = 7,1 Hz), 1,70-1,76 (m, 1 H), 1,80-1,90 (m, 2 H), 2,02 (d, 2 H, J = 12,9 Hz), 2,51 (s, 2 H), 4,18 (q, 2 H, J = 7,1 Hz)

Paso iv Síntesis de la 5α,7β,9β-7,9-Dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (8e)

Etil éster del ácido 1α,3β,5β-(1-ciano-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8d, 5,82 g, 26,1 mmol) se disolvió en MeOH (150 ml), se trató con 10% Rh/2% Pd/C (1,0 g) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 28 h La reacción se filtró y se concentró en vacío El residuo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente de 2 3 hexano/EtOAc, EtOAc, 5% MeOH/EtOAc para dar 2,21 g (47%) del producto deseado

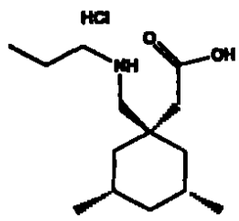
MS 182,0 (M+1 para $C_{11}H_{19}N_1O_1$), punto de fusión 116°C-118°C, TLC SiO_2, R_f 0,36 (6% MeOH/CH_2Cl_2), Análisis ($C_{11}H_{19}N_1O_1$) (Cal) C 72,88, H 10,56, N 7,73 (hallado) C 72,84, H 10,67, N 7,63 ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0,49 (dd, 1H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,86-0,93 (m, 8 H), 1,38-1,48 (m, 2 H), 1,60-1,71 (m, 3 H), 2,09 (s, 2 H), 3,16 (s, 2 H), 5,79 (br, 1 H)

484
844

Paso v Síntesis de la sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico (8) La 5α,7β,9β-7,9-dimetil-2-aza-espiro[4 5]decan-3-ona (8e, 0,52 g, 2,87 mmol) se trató con HCl a 6N (19 ml) y se calentó a reflujo toda la noche La reacción se enfrió a temperatura ambiente, con lo cual se formo un precipitado blanco El sólido se filtró, y el filtrado se enfrió a 0°C para lograr una segunda cosecha de cristales, luego se filtró nuevamente Los sólidos se combinaron y se secaron bajo vacío para dar 0,46 g (68%) del producto deseado

MS 200,1 (M+1 para $C_{11}H_{21}N_1O_2$), punto de fusion 179°C-180°C, Análisis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 56,04, H 9,41, N 5,94 (hallado) C 56,16, H 9,42, N 5,73 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,46-0,53 (m, 1 H), 0,77 (t, 1 H, J = 12,5 Hz), 0,85-0,91 (m, 7 H), 1,55-1,67 (m, 5 H), 2,11 (d, 2 H, J = 13,4 Hz), 2,36 (s, 2 H), 2,44 (s, 1 H), 3,14 (s, 2 H)

EJEMPLO 9 Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético

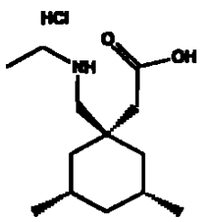


Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8, 1,0g, 4,2 mmol) se disolvió en EtOH (100 ml), se trató con una solución de hidróxido de sodio (1N, 5 ml), propionaldehído (0,9 ml, 12,6 mmol) y 10% de Pd/C (0,3g) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 3 h La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O (1 M, 10 ml) y se concentro en vacio El residuo se trató con isopropanol caliente (100 ml), el NaCl se filtró, y la solución clara se concentró en vacío El product rudo se recristalizó desde i-PrOH/acetona/hexano (14 200 225 ml) y se secó bajo vacío para dar 0,136 g (12%) del producto deseado

MS 242,1 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 178°C-180°C, Análisis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$ HCl 0,27H_2O) (Cal) C 59,48, H 10,18, N 4,95 (hallado) C 59,53, H 10,21, N 4,78 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,52 (dd, 1 H, J = 24,2, 12,0 Hz), 0,83-0,90 (m, 8 H), 1,00 (t, 3 H, J = 7,6 Hz), 1,61-1,80 (m, 7 H), 2,43 (s, 2 H), 2,98 (t, 2 H, J = 7,8 Hz), 3,20 (s, 2 H)

~~259~~ 483
846

EJEMPLO 10 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético

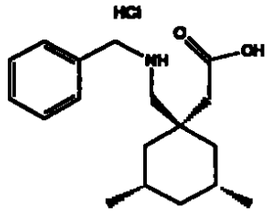


El Ejemplo 10 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó acetaldehído en lugar de propionaldehído y se uso aceletato de etilo/heptano para la recristalización (rendimiento 30%)

MS (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 188°C-190°C, ^1H NMR (DMSO) δ 0,83 (8H, br d), 1,24 (3 H, t, J = 7,1 Hz), 1,60 (6 H, m), 2,38 (d, s), 2,98 (2 H, m), 3,10 (2 H, br s), 8,33 (2 H, br s), 12,42 (1 H, br s)

760 764 847

EJEMPLO 11 Sal de Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil-acético

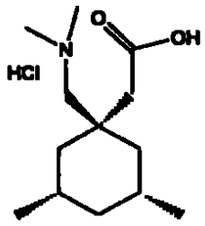


El Ejemplo 11 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó benzaldehído en lugar de propionaldehído y que se usó Et_2O para la recristalización (rendimiento 30%)

MS 290,1 (M+1 para $C_{18}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 162°C-163°C, Análisis ($C_{18}H_{27}N_1O_2$ HCl 0,2$OH_2$0) (Cal) C 65,62, H 8,69, N 4,25 (hallado) C 65,60, H 8,71, N 4,31 ^{1}H NMR ($CD_3$0D) δ 0,48 (dd, 1 H, J = 12,5 Hz), 0,79-0,90 (m, 8 H), 1,46 (br, 2 H), 1,64 (d, 3 H, J = 13,4 Hz), 2,42 (s, 2 H), 3,19 (s, 2 H), 4,23 (s, 2 H), 7,43-7,50 (m, 5 H)

761 485
848

EJEMPLO 12 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico

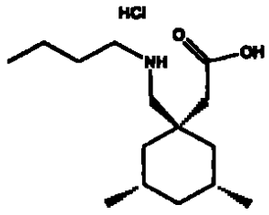


Una solución de la sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético (8, 0,20 g, 0,59 mmol) en EtOH (15 ml), solución de hidróxido de sodio (1 N, 0,59 mmol) y H_2O (1 ml) se trató con 20% de Pd/C (50 mg) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 15 horas) La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O a 1 N (1 ml) y se concentro en vacío El residuo se disolvió en i-PrOH caliente (4 ml), se diluyó con acetona (100 ml) y Et_2O (350 ml) y se enfrió a 0°C El sólido se filtró y se secó bajo vacío para dar 103 mg (rendimiento del 70%) del producto deseado

MS 228,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusion 195°C-196°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl 0,41H_2O) (Cal) C 57,58, H 9,97, N 5,16 (hallado) C 57,73, H 9,71, N 4,91 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,56 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,89-0,92 (m, 8, H), 1,59-1,75 (m, 8 H), 2,51 (s, 2 H), 2,95 (s, 6 H), 3,44 (s, 2 H)

762 486
849

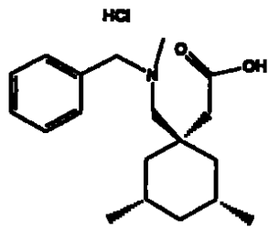
EJEMPLO 13 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético



El ejemplo 13 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó butiraldehído en lugar de propionaldehído (rendimiento del 48%)

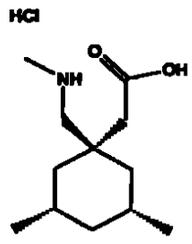
MS 256,1 (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$) punto de fusion 184°C-185°C, Análisis ($C_{15}H_{29}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 61,73, H 10,36, N 4,80 (hallado) C 61,71, H 10,21, N 4,72 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,0 Hz), 0,86-0,99 (m, 11 H), 1,37-1,47 (m, 2 H), 1,60-1,75 (m, 7 H), 2,43 (s, 2 H), 3,02 (t, 2 H, J = 8,1 Hz), 3,20 (s, 2 H)

EJEMPLO 14 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-{1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico



El Ejemplo 14 se preparó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usaron el análogo de N-bencilo (11) y formaldehído como los materiales iniciales y que se usó PtO_2 como el catalizador en lugar de Pd/C (rendimiento del 70%) MS 304,1 (M+1 para $C_{19}H_{29}N_1O_2$), punto de fusion 209°C-210°C, Análisis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$ HCl 0,21$H_2$0) (Cal) C 66,40, H 8,92, N 4,08 (hallado) C 66,40, H 9,05, N 4,06 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,51 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,2 Hz), 0,79-0,92 (m, 9 H), 1,29 (br, 1 H), 1,56-1,82 (m, 4 H), 2,51 (dd, 2 H, J = 18,8, 16,3 Hz) 2,85 (s, 2 H), 3,23-3,49 (m, 2 H), 4,37 (dd, 2 H, J = 31,7, 12,7 Hz), 7,45-7,54 (m, 5 H)

EJEMPLO 15 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acetico

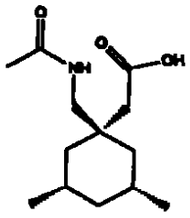


El Ejemplo 14 (0,14 g, 1,21 mmol) se disolvió en 95% de EtOH (50 ml), se trató con solución de hidróxido de sodio (1 N, 1,21 mmol) así como 20% de Pd/C (0,1 g), y se agitó bajo una

851

atmósfera de H_2 (50 psi) durante 45 minutos La reación se filtró, se trató con HCl/Et_2O (1 M, 1 ml), y se concentró en vacio El residuo se trató con iPr/OH caliente, el NaCl se filtró y la solución se concentró en vacío El producto crudo se recristalizó desde iPrOH/acetona/hexano (7 150 110 ml) y se seco bajo vacío para dar 0,189 (63%) del producto deseado
MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 182°C-183°C, Analisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl H_2O) (Cal) C 57,70, H 9,68, N 5,61 (hallado) C 57,47, H 9,58, N 5,35 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,52 (dd, 1 H, J = 24,4, 12,2 Hz), 0,84-0,98 (m, 8 H), 1,57-1,72 (m, 5 H), 2,38 (s, 2 H), 2,72 (s, 3 H), 3,21 (s, 2 H)

EJEMPLO 16 Acido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético



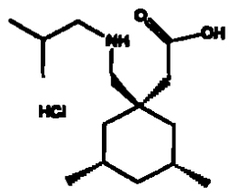
El Ejemplo 8 (0,5 g, 21, mmol) se trató con H_2O (10 ml) y NaOH (0,56 g, 14,0 mmol), se enfrio a 0°C y se trató con anhidrido acético La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se diluyo con ELOAc (100 ml) y se lavó con HCl

765 852

1N (100 ml) La capa orgánica se seco sobre Na_2SO_4 y se concentró en vacío El material crudo fue sometido a cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 4% de $MeOH/CH_2Cl_2$ para dar 0,138 g (27%) del producto deseado como un aceite que se solidificó bajo vacío

MS 242,1 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_3$), punto de fusión 122°C-124°C, Análisis ($C_{13}H_{23}N_1O_3$) (Cal) C 64,70, H 9,61, N 5,80 (hallado) C 64,65, H 9,59, N 5,63 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,46 (dd, 1 H, J = 23,7, 11,7 Hz), 0,81-0,87 (m, 9 H), 1,56 (d, 2 H, J = 13,4 Hz), 1,65-1,76 (m, 3 H), 1,98 (s, 3 H), 2,18 (s, 2 H), 3,30 (s, 3 H)

EJEMPLO 17 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético

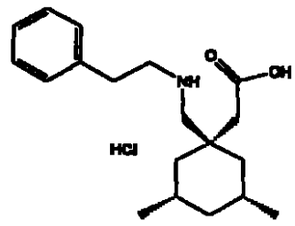


El Ejemplo 17 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó isobutiraldehído en lugar de propionaldehído (rendimiento del 53%)

MS 256 (M+1 para $C_{15}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 193°C-194°C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1H, J = 24,3, 12,5 Hz), 0,81-0,90 (m, 2

H), 0,89 (d, 6H, J = 6,4 Hz), 1,03 (d, 6H, J = 6,8 Hz), 1,57-1,71 (m, 5H), 2,09 (m, 1 H), 2,49 (s, 2 H), 2,88 (d, 2H, J = 7,1 Hz), 3,19 (s, 2 H)

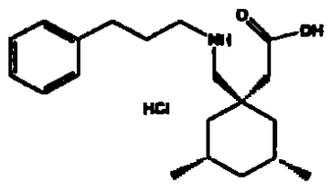
EJEMPLO 18 Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético



El Ejemplo 18 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó fenilacetaldehído en lugar de propionaldehído (rendimiento del 16%)

MS 304 (M+1 para $C_{19}H_{29}N_1O_2$), punto de fusión 188°C-189°C, Análisis ($C_{19}H_{29}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 67,14, H 8,90, N 4,12 (hallado) C 66,94, H 8,91, N 3,98 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,46 (dd, 1 H, J = 24,6, 12,3 Hz), 0,81-0,91 (m, 8 H), 1,58-1,72 (m, 5 H), 2,50 (s, 2H), 3,04-3,08 (m, 2H), 3,26-3,30 (m, 4H), 7,23-7,75 (m, 5H)

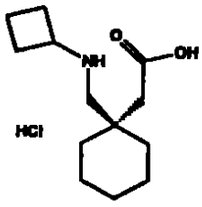
EJEMPLO 19 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico



El ejemplo 19 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó hidrocinamaldehído en lugar de propionaldehído (rendimiento del 50%)

MS 318 (M+1 para $C_{20}H_{31}N_1O_2$), punto de fusión 171°C-172°C, Análisis ($C_{20}H_{31}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 67,87, H 9,11, N 3,96 (hallado) C 67,83, H 9,13, N 3,78 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,6, 12,1 Hz), 0,80-0,90 (m, 2 H), 0,90 (d, 6H, J = 6,0 Hz), 1,60-1,72 (m, 5 H), 2,03-2,11 (m, 2H), 2,45 (s, 2H), 2,73 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,06 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 3,3 (s, 2H), 7,20-7,18 (m, 5H)

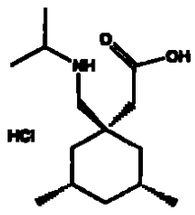
EJEMPLO 20 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético



El Ejemplo 20 se sintetizo de acuerdo con el Ejemplo 26, salvo porque se usó ciclobutano en lugar de 2-metilbutiraldehido (rendimiento del 70%)

MS 226 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_2$) punto de fusión 176°C-177°C, Análisis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,64, H 9,24, N 5,35 (hallado) C 59,88, H 9,18, N 5,19 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,16-1,60 (br, 10 H), 1,80-1,96 (m, 2 H), 2,21-2,40 (m, 4 H), 2,53 (s, 2H), 2,97 (s, 2H), 3,73 (M, 1 H)

EJEMPLO 21 Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[1-(isopropilamino-metil)-3-dimetil-ciclohexil]-acético



El Ejemplo 21 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 9, salvo que se usó acetona en lugar de propionaldehído (rendimiento del 50%)

MS 242 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 206°C-207°C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,53 (dd, 1 H, J = 24,8, 12,5 Hz), 0,80-0,90 (m, 2 H), 0,99 (d, 6H, J = 6,1 Hz), 1,35 (d, 6H, J = 6,6 Hz), 1,55-1,78 (m, 5H), 2,45 (s, 2H), 3,18 (s, 2 H), 3,41 (m, 1H)

969-498
856

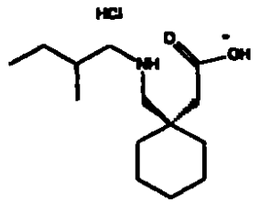
EJEMPLO 22 El acido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 23 El acido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 24 La sal de sodio del acido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 4 087 544, 2 de mayo de 1978

EJEMPLO 25 La sal de sodio del acido 1-(1-hidroximetil)ciclohexano-acético se describió anteriormente en Satzinger et al, US 2 960 441, 1960

EJEMPLO 26 Síntesis de la sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico



Una solución del ácido (1-aminometil-ciclohexil)-acético (Ejemplo 22, 2,0 g, 11,7 mmol) en EtOH (100 ml) se trató con 2-metil-butiraldehido (4 ml, 35,1 mmol) y PtO_2 (0,5 g) y se agitó bajo una atmósfera de H_2 (50 psi) durante 2 h La reacción se filtró, se trató con HCl/Et_2O a 1 N (12 ml), se concentró en vacio, se disolvió en i-PrOH caliente (10 ml), se diluyó con acetona (600 ml), se enfrió a 0°C y se filtró para dar 1,58 g (49%) del producto deseado

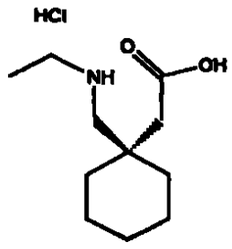
MS 242,1 (M+1 para $C_{14}H_{27}N_1O_2$), punto de fusión 162°C-163°C, Análisis ($C_{14}H_{27}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 60,52, H 10,16, N 5,04 (hallado) C 60,41, H 10,26, N 4,95 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,95 (t, 3 H, J = 7,3 Hz), 1,02 (d, 3 H, J = 6,6 Hz), 1,20-1,31 (m, 1 H), 1,42-1,56 (m, 11 H), 1,81-1,89 (m, 1 H), 2,63 (dd, 2 H, J = 18,3, 16,1 Hz), 2,82 (dd, 1 H, J = 12,5, 8,3 Hz), 2,99 (12,5, 6,1 Hz), 3,07 (dd, 2 H, J = 25,6, 12,9 Hz)

EJEMPLO 27 La sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó 4-trifluorobutiraldehido en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 19%)

MS 282,1 (M+1 para $C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$), punto de fusión 163°C-164°C, Análisis ($C_{13}H_{22}N_1O_2F_3$ HCl $0,05H_2O$) (Cal) C 49,00, H 7,31, N 4,40 (hallado) C 48,60, H 7,29, N 4,19 ^1H NMR (CD_3OD) δ

1,40-1 ,4 (m, 11 H), 1,96-2,04 (m, 2 H), 2,26-2,38 (m, 2 H), 2,57 (s, 2H), 3,09-3,13 (m, 4 H)

EJEMPLO 28 Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético

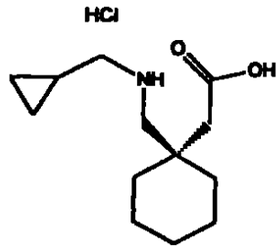


El Ejemplo 28 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó acetaldehído en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 30%)

MS 200,1 (M+1 para $C_{11}H_{21}N_1O_2$), punto de fusión 160°C-166°C, Análisis ($C_{11}H_{21}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 56,04, H 9,41, N 5,94 (hallado) C 55,98, H 9,36, N 5,79 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,31-1,54 (m, 13 H), 2,54-2,56 (m, 2 H), 3,06-3,13 (m, 4 H)

EJEMPLO 29 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(Ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético

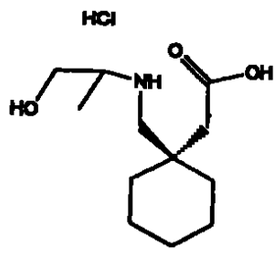
276-296
859



El Ejemplo 29 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo porque se usó ciclopropanocarboxaldehido en lugar de 2-metilbutiraldehido (rendimiento del 62%)

MS 226 (M+1 para $C_{13}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 177°C-178°C, Análisis ($C_{13}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,64, H 9,24, N 5,35 (hallado) C 59,72, H 9,15, N 5,27 ^1H NMR (CD_3OD) δ 0,50-0,56 (m, 2 H), 0 71-0 74 (m, 2H), 1 05-1 30 (m, 1 U), 1 42-1 54 (m, 1OH), 2,52 (s, 2H), 2,94 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 3,10 (s, 2H)

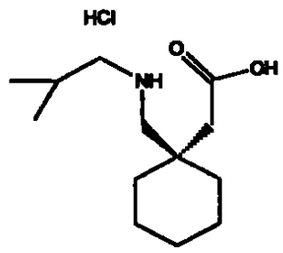
EJEMPLO 30 Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético



El Ejemplo 30 se sintetizo de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se uso 1-hidroxi-2-propano en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 60%)

MS 230 (M+1 for $C_{12}H_{23}N_1O_3$), punto de fusion 164°C-165°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_3$ HCl) (Cal) C 54,23, H 9,10, N 5,27 (hallado) C 54,23, H 9,01, N 5,18 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,30-1,32 (m, 3 H), 1,44-1,55 (m, 10H), 2,60 (s, 2H), 3,11 (m, 2H), 3,28 (br, 2H), 3,37 (hr, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,78-3,81 (m, 1H)

EJEMPLO 31 Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético



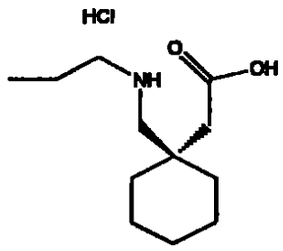
El Ejemplo 31 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó ciclopropanocarboxaldehido en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 35%)

1

MS 228 (M+1 para $C_{13}H_{25}N_1O_2$) punto de fusión 175°C-176°C, Análisis ($C_{13}H_{25}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 59,19, H 9,93, N 5,51, (hallado) C 59,28, H 9,98, N 5,24 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,03 (d,

6H, J = 6,9 Hz), 1,37-1,60 (m, 10H), 2,10-2,17 (m, 1H), 2,63 (s, 2H), 2,87 (d, 2H, J = 7,4 Hz), 3,07 (s, 2H)

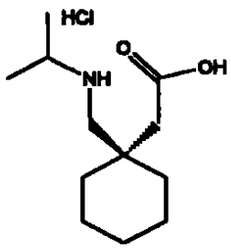
EJEMPLO 32 Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético



El Ejemplo 32 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó propionaldehido en lugar de 2-metilbutiraldehido

MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusion 174°C-177°C, Análisis ($C_{12}H_{23}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 57,70, H 9,69, N 5,61 (hallado) C 57,55, H 9,77, N 5,48 ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 0,93 (t, 1 H, J = 6,3 Hz), 0,99-1,03 (m, 4 H), 1,40-1,54 (m, 13 H), 1,72-1,78 (m, 2 H), 2,96-3,29 (m, 2 H)

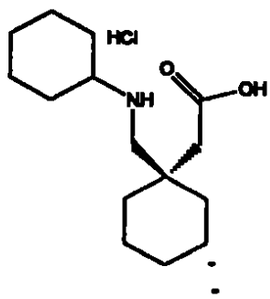
EJEMPLO 33 Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acetico



El Ejemplo 33 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo porque se usó acetona en lugar de 2-metilbutiraldehído

MS 214,1 (M+1 para $C_{12}H_{23}N_1O_2$), punto de fusión 193°C-194°C, ^1H NMR (CD_3OD) δ 1,29-1,57 (m, 18 H), 2,59 (s, 2 H), 3,07 (s, 2 H), 3,38-3,42 (m, 1H)

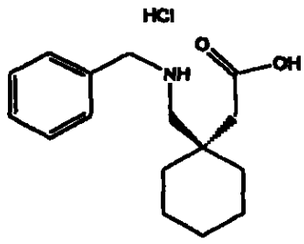
EJEMPLO 34 Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético



El Ejemplo 34 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó ciclohexanona en lugar de 2-metilbutiraldehído (rendimiento del 48%)

MS 254 (M+1 para $C_{15}H_{27}N_1O_2$) punto de fusión 198°C-199°C, Análisis ($C_{10}H_{27}N_1O_2$ HCl) (Cal) C 62,12, H 9,74, N 4,83 (hallado) C 62,18, H 9,84, N 4,75 ^{1}H NMR (CD30D) 8 1,20-1,60 (m, 16 H), 1,63-1,76 (m, 1H), 1,88 (br, 2H), 2,13 (br, 2H), 2,60 (m, 2H), 3,09 (m, 3H)

EJEMPLO 35 Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil)-acetico



El Ejemplo 35 se sintetizó de acuerdo con el método del Ejemplo 26, salvo que se usó benzaldehido en lugar de 2-metilbutiraldehido

MS 262,0 (M+1 para $C_{19}H_{23}N_1O_2$) punto de fusión 125°C-135°C, ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1,38-1,49 (m, 11 H), 2,55 (s, 2 H), 3,07 (s, 2 H), 4,23 (s, 2 H), 7,43-7,49 (m, 5 H)

727 502
864

EJEMPLO 36 Resumen

Usando un modelo fuera del cuerpo vivo de retinas de ratas recién disecadas, se investigaron los mecanismos por los cuales los niveles de glutamato en el cerebro son mantenidos dentro de los límites normales La síntesis de glutamato anaplerótico puede ser importante para reabastecer de glutamato oxidado en la glia después de una neurotransmisión Los puntos de control de velocidad a través de esta vía de renovación se identificaron como carboxilación de piruvato y transaminación de cadena de amino ramificada Para ensayar la relación entre la síntesis del glutamato y la actividad de la carboxilasa de piruvato, la síntesis del ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ se midió en función del piruvato del medio El incremento del piruvato de 0,2 mM a 5 mM incrementó la síntesis de los ^{14}C-aminoácidos en un 66% ± 15% La radioactividad específica de la glutamina en relación con la de $H^{14}CO_3$ pasados 20 minutos de incubación indicó que un ≈30% de glutamina en la retina deriva de la fijación de bicarbonato Para ensayar la dependencia de la síntesis del glutamato con respecto a los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) como una fuente de nitrógeno, se midió el efecto de la inhibición de la aminotransferasa de cadena ramificada neuronal (BCATc) La gabapentina (GBP) (1 mM), un inhibidor selectivo de la

378 502
865

BCAAc en las neuronas, inhibió la síntesis del ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ en un 31% sin hacer más lenta la incorporación de $H^{14}CO_3$ en los intermedios de ciclo de lactato y ácido cítrico. La inhibición de la nueva síntesis del glutamato fue invertida por el agregado de BCAA a 0,6 mM. Los datos indicaron que la carboxilasa de piruvato y la aminotransferasa de cadena ramificada comparten el control de la velocidad de la nueva síntesis del glutamato en la retina, y que la nueva síntesis del glutamato es cuantitativamente importante para mantener los niveles de glutamato retinal.

Métodos

Animales experimentales

Se usaron ratas Sprague Dawley (200 g - 400 g) para todos los experimentos. Las ratas fueron alojadas en un ciclo de luz y sombra de 12 horas, y provistas de alimento y agua sin límite. Después de anestesiar las ratas con nembutal (intraperitoneal), se les extirparon los ojos y se disecaron las retinas en un tampón helado.

Fijación del CO_2

Las medias retinas recién aisladas se preincubaron a 37°C durante 3 minutos en el tampón A (pH 7,4) que contenía NaCl a

779 503
866

118 mM, KCl a 4,7 mM, CaCl a 2,5 mM, KH_2PO_4 a 1,2 mM, $MgSO_4$ a 1,17 mM, HEPES a 20 mM, glucosa a 5 mM, NH_4Cl a 0,05 mM y $NaH^{14}CO_3$ a 25 mM También se incluyó piruvato (a 0,2 mM o 5 mM) en el tampón 1 ml del tampón al igual que la fase de gas dentro de los tubos de 20 ml se equilibraron con 95% de O_2, 5% de CO_2 Las incubaciones se iniciaron con el agregado de 10 µCi/ml de $H^{14}CO_3$ Los recipientes fueron cerrados inmediatamente a la atmósfera La mayor parte de la incubación continuó durante 20 minutos, aunque en algunos estudios preliminares, se variaron los tiempos de 10 a 60 minutos Las reaciones fueron detenidas removiendo las medias retinas del tampón y colocándolas en 2% de ácido perclórico El tampón se acidificó por separado con ácido perclórico (concentración final del 2%) y se dejó que el $^{14}CO_3$ sin reacionar se difundiera fuera de las muestras acidificadas

La cantidad total del producto (metabolitos de carbono 14 no volátiles) se determino midiendo la radioactividad en alícuotas del medio y muestras de tejido Los metabolitos en los extractos fueron separados mediante cromatografía de acetato de Dowex-1 como se describió previamente Williamson, J R , y Corkey, B (1969) "Métodos en Enzimologia", Volumen 13, ed Lowenstein, J M (*Academic Press*) páginas 434-513, y fueron cuantificados mediante el recuento por centelleo En la mayor parte de los casos, los datos de carbono 14 de cada

metabolito se informan como la suma de la radioactividad en el medio más los extractos de tejidos La cuantificación completa de las cantidades de ^{14}C-metabolitos en la retina y en el medio pueden hallarse en las Tablas I y II

Los datos que no se muestran en los resultados y en las secciones de discusión se recogieron en el transcurso de la realización de la evaluación de la influencia del piruvato sobre la fijación del $H^{14}CO_3$ en la retina La Figura 2 muestra solamente el efecto del piruvato sobre la suma del glutamato más la glutamina y sobre la suma del piruvato más el lactato La Tabla I proporciona los valores para todos los metabolitos que se etiquetaron con $H^{14}CO_3$ y su compartimentación

De igual manera, los datos adicionales, que no se muestran en los resultados y las secciones de discusión, se recogieron durante la evaluación de la influencia de la gabapentina Por lo tanto, la Tabla II es una expansión de los datos mostrados en la Figura 4, y proporciona valores para todos los metabolitos etiquetados con $H^{14}CO_3$ y su compartimentación

Tabla I

Condición	Compar-timiento	Gln	Glu	Asp	Lact	Ciclo de TCA	Total
Control (0,2 Pyr)	interno	0,59 ±0,05	1,47 ±0,29	0,85 ±0,06	0,16 ±0,06	1,02 ±0,26	4,08 ±0,41
	externo	0,61 ±0,08	0,04 ±0,01	0,08 ±0,01	0,55 ±0,03	0	1,19 ±0,13
	suma	1,20 ±0,09	1,51 ±0,29	0,93 ±0,08	0,71 ±0,06	1,02 ±0,26	5,27 ±0,45
+5,0 Pyr	interno	0,91 ±0,13	0,91 ±0,29	1,08 ±0,12	0,29 ±0,04	2,31 ±0,13	7,26 ±0,61
	externo	0,96 ±0,14	0,06 ±0,01	0,08 ±0,01	1,18 ±0,11	0	2,24 ±0,21
	suma	1,87 ±0,23	2,73 ±0,28	1,16 ±0,12	1,47 ±0,13	2,31 ±0,13	9,50 ±0,74

Tabla II

Condición	Compar-timiento	Gln	Glu	Asp	Lact	Ciclo de TCA	Total
Control	interno	0,440 ±0,032	1,477 ±0,097	0,634 ±0,038	0,080 ±0,08	1,096 ±0,105	3,715 ±0,266
	externo	0,551	0,08	0,070	0,478	0	1,117

782 869

		±0,036	±0,001	±0,003	±0,030		±0,075
	suma	0,991 ±0,054	1,485 ±0,096	0,704 ±0,040	0,558 ±0,031	1,096 ±0,105	4,832 ±0,303
+GBP	interno	0,389 ±0,026	1,324 ±0,025	0,549 ±0,019	0,089 ±0,006	1,514 ±0,103	3,902 ±0,122
	externo	0,545 ±0,024	0,008 ±0,003	0,035 ±0,003	0,516 ±0,030	0	1,066 ±0,028
	suma	0,934 ±0,036	1,332 ±0,025	0,584 ±0,022	0,605 ±0,028	1,514 ±0,103	4,968 ±0,028
+GBP +BCAA	interno	0,480 ±0,011	1,549 ±0,070	0,609 ±0,021	0,086 ±0,008	1,220 ±0,116	3,989 ±0,043
	externo	0,806 ±0,086	0,009 ±0,001	0,093 ±0,008	0,458 ±0,048	0	1,322 ±0,076
	suma	1,286 ±0,082	1,558 ±0,070	0,702 ±0,016	0,5445 ±0,040	1,220 ±0,116	5,311 ±0,119

El procedimiento cromatográfico empleado en este ejemplo separa la glutamina, el glutamato, el aspartato y el ácido láctico Los intermedios del ciclo del ácido cítrico permanecen en las columnas de Dowex y se estiman como la diferencia entre los recuentos totales en la muestra y los recuentos que son eluidos La prueba de la validez de este procedimiento se han informado previamente Antes de someter las muestras a la cromatografía, el ^{14}C-ácido pirúvico en las

783 870

muestras fue convertido en forma estequiométrica en lactato tratando las muestras con exceso de NADH y deshidrogenasa de lactato En consecuencia, se informa que el unico pico de lactato contiene todos los carbonos 14 en el lactato y el piruvato Para determinar la actividad especifica del glutamato y la glutamina en las muestras retinales, se midió fluorométricamente la cantidad de masa del glutamato usando un procedimiento enzimático Patel, M S (1989) en Neurométodos Metabolismo de los Carbohidratos y la Energia, Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (*The Humana Press, Inc*) páginas 309-340 La cantidad de masa de la glutamina se midió después de la separación cromatográfica del glutamato seguida por la determinación luminométrica descripta anteriormente ATP y el fosfato de creatina se midieron fluorométricamente usando un ensayo de enzimas

La proteína retinal se determinó usando el ensayo de proteína DC (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) Cada media retina contenía 0,4 mg de proteína

Ensayo de la Carboxilasa de Piruvato

La actividad de la carboxilasa de piruvato se ensayó en muestras nuevas de cerebro completo y de retinas extirpadas Se usó el método descripto por Patel, M S (1989) en

784 798
871

Neurométodos Metabolismo de los Carbohidratos y de la Energía, Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (The Humana Press), páginas 309-340, que consiste en medir la fijación del $^{14}CO_3$ en condiciones optimas en tejido

Inmunotransferencia

Se realizó SDS-PAGE como lo describió en Patel, M S (1989) en *Neurométodos Metabolismo de los Carbohidratos y de la Energía*, Volumen II, eds Boulton, A A y Baker G D (The Humana Press, Inc), página 309-340, usando 10% de gel Para la inmunotransferencia, se transfirieron proteínas a las membranas de Immobilon P Las membranas fueron bloqueadas con 5% de BSA e incubadas con el anticuerpo de péptido de BCATc antiratas de conejo purificado por inmunoafinidad (1 1 00 de dilución) o el anticuerpo de péptido de BCATm antihumano de conejo purificado por inmunoafinidad (1 1 000 de dilución) Las bandas de la proteina inmunoreactiva se visualizaron usando el sistema de ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)

Cálculos y Estadísticas

Los datos se informan en el texto y las figuras determinando los dpm/mg en un metabolito particular y dividiendo por la

X85 309
872

actividad especifica del HCO_3 del medio En consecuencia, todos los datos se informan como nmoles de $H^{14}CO_3$/mg de proteina para cualquier metabolito dado

Los resultados se dan como el medio ± error estandar del medio La significación estadistica se juzgó con el ensayo t emparejado y un $p<0,05$ Los numeros de las determinaciones independientes (n) se proporcionan en leyendas en las figuras y en las tablas

RESULTADOS

Los niveles de carboxilasa de piruvato son similares en la retina y en el cerebro completo

Patel demostró que la carboxilasa de piruvato es la principal enzima fijadora del CO_2 en el cerebro de roedores adultos Para juzgar si esto también puede ser cierto en la retina, la actividad de la carboxilasa de piruvato a 37°C en sonicatos de la neocorteza fue comparada con aquellos de la retina Los niveles de la neocorteza (2,9 ± 0,1 nmoles de $H^{14}CO_3$ fijado/min/mg) fueron similares a aquellos hallados en los tejidos retinales (3,4 ± 0,4 nmoles de $H^{14}CO_3$ fijado/min/mg, lo cual indica que la carboxilasa de piruvato fue casi tan activa en la retina como en el cerebro completo

786 539
873

Velocidades de la fijacion de $^{14}CO_2$ y de la apariencia del ^{14}C-glutamato en función de los niveles de piruvato en la retina

En los experimentos preliminares las retinas se incubaron con piruvato a 0,2 mM como se describió en los métodos para períodos de 10, 20, 40 y 60 minutos Se monitoreó tanto el $^{14}CO_2$ total como los niveles de ATP y de fosfato de creatina Los niveles de ATP y de fosfato de creatina permanecieron constantes en función del tiempo, lo cual demostró que la oxigenación y el control del pH fueron adecuados durante todo el experimento La fijación del CO_2 total (5,50 ± 0,14 nmoles/mg de proteina) tuvo picos entre los 20 y los 40 minutos, pero ya era un 76% del máximo (4,2 ± 0,1 nmoles/mg) a los 10 minutos Como los niveles de ATP (20 ± 0,2 nmoles/mg) y de fosfato de creatina (16 ± 1,1 nmoles/mg) fueron altos y no cambiaron con el tiempo, este pico indicó que la velocidad de fijación del CO_2 fue constante, pero que la rotura continua de los productos de carbono 14 no volátiles a CO_2+H_2O produjo un nivel de estado casi estacionario de la radioactividad específica del glutamato y la glutamina a los 20 minutos

Para estimar el control de la carboxilación de piruvato sobre la síntesis del glutamato, las retinas se incubaron con piruvato a 0,2 mM o 5 mM en el medio y se analizaron los

787 542
874

metabolitos intracelulares y extracelulares El $^{14}CO_2$ total fijado a los 20 minutos en la presencia del piruvato a 0,2 mM fue 5,27 ± 0,45 nmoles de $H^{14}CO_3$/mg, mientras que aquel fijado en la presencia de piruvato a 5 mM fue 9,50 ± 0,74 nmoles de $H^{14}CO_3$/mg La Figura 2 muestra que el incremento en el piruvato no etiquetado desde 0,2 mM hasta 5 mM aumenta la suma de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina (de 1,74 ± 0,19 a 2,90 ± 0,31 nmoles/mg, $p<0,005$) La Figura 2 también muestra que la incubación de piruvato más elevada aumenta los valores de ^{14}C-lactato más ^{14}C-piruvato Por lo tanto, en estado estacionario, un aumento en la concentración del piruvato de 0,2 mM a 5 mM aumentó la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el glutamato y la glutamina en un 60%, mientras que el aumento en el piruvato aumentó la incorporación de $H^{14}CO_3$ en el piruvato y e el lactato un 111% El carbono 14 ciclado en el piruvato y en el lactato representa el reciclado glial a través de la carboxilasa de piruvato, la enzima málica y la carboxicinasa de fosfoenolpiruvato y por primera vez demuestra la descarboxilación del ciclo del acido citrico activo en el tejido neural intacto

Estos datos muestran que un aumento en el flujo a través de la carboxilasa de piruvato induce un aumento en la nueva síntesis

del glutamato retinal Simultáneamente, ocurre un aumento algo mayor en el reciclado del piruvato

Una fraccion importante de la síntesis de la glutamina deriva de la carboxilacion del piruvato

La importancia de la carboxilación del piruvato como una fuente para reabastecer del glutamato liberado desde las terminaciones nerviosas retinales durante la transmision neuronal se estimó determinando la radioactividad específica de la glutamina en el tejido retinal incubado con el medio que contiene $H^{14}CO_3$ Una proporción fija de la síntesis de la glutamina en la retina deriva del glutamato no etiquetado liberado por las neuronas y recogido por la glia de Müller El resto proviene del α-cetoglutarato glial sintetizado anapleróticamente desde el piruvato y el $^{14}CO_2$ En consecuencia, la radioactividad especifica de la glutamina comparada con la actividad específica del $H^{14}CO_3$ proporciona un valor mínimo para la proporcion de la glutamina derivada de la anaplerosis El producto de la carboxilasa de piruvato en la glia es [1,4-^{14}C]-oxaloacetato Las posiciones 1 y 4 se etiquetan porque el carbono 14 inicialmente incorpora en la posición 4-C del oxaloacetato se reparte al azar entre las posiciones 1 y 4 mediante el equilibrio del oxaloacetato con fumarato asimétrico El oxaloacetato etiquetado se condensa

789 876

con piruvato para formar citrato, que luego se isomeriza hacia isocitrato El [1,4-^{14}C]-isocitrato es oxidado y descarboxilado hacia el [5-^{14}C] α-cetoglutarato por la deshidrogenasa de isocitrato En consecuencia, el α-cetoglutarato sintetizado anaplerόticamente tiene aproximdamente la mitad de la radioactividad especifica del $H^{14}CO_3$ del sustrato original, según el grado de selección al azar de la etiqueta en el oxaloacetato Esto también es cierto para la glutamina sintetizada desde el [5-^{14}C] α-cetoglutarato

La actividad especifica de la glutamina se midió en los extractos de tejido retinal incubados con piruvato a 0,2 mM y $H^{14}CO_3$ para los 10, 20, 40 y 60 minutos Solamente se informa la glutamina del tejido (no del medio La radioactividad específica de la glutamina en el tejido fue constante entre los 10 y los 60 minutos Después de 20 minutos de incubación la cantidad de masa de glutamina en el tejido fue de 4,50 ± 0,44 nmoles/mg, y su radioactividad específica fue de 1 970 ± 115 dpm/nmol o de 0,158 ± 0,009 dpm/nmol de la actividad específica del bicarbonato Esto indica que un 32% de la glutamina fue producida por la anaplerosis y la carboxilasa de piruvato

La radioactividad espcífica del glutamato retinal (269 ± 8 dpm/nmol) fue menor que la de la glutamina y también constante

290 594
877

en función del tiempo desde los 10 a los 60 minutos Fue sólo del 14% de la actividad específica de la glutamina Esto sugiere que la devolución metabólica del glutamato en las neuronas es rápida con respecto a la síntesis anaplerótica Sin embargo, como la devolución de glutamato neuronal no puede reabastecer del esqueleto de carbono de glutamato perdido durante la neurotransmisión, la vía anaplerótica es de fundamental importancia en el mantenimiento de los niveles de glutamato Los presentes datos muestran inequívocamente que la vía anaplerótica proporciona una importante proporción (≈32%) de la glutamina requerida para el reabastecimiento de glutamato

La síntesis del glutamato y la glutamina retinales depende parcialmente de la transaminacion de los aminoácidos de cadena ramificada

Estudios recientes de la síntesis del glutamato en astrocitos cultivados sugirieron que la conversión del α-cetoglutarato al glutamato puede actuar como un paso de control de la velocidad en la síntesis anaplerótica del glutamato Varios grupos han indicado que el grupo α-amino del glutamato no puede ser suministrado como amoniaco y debe en consecuencia ser suministrado por la transaminacion del α-cetoglutarato con

545
878

otro aminoácido Kanamori, K , Ross, B D , y Kondrat, R W (1998) *J Neurochem* 70, 1304-1315, Laemmli, Reino Unido (1970) *Nature* 227, 680-885, que incluye Haberg, A , Qu, H , Bakken, I J , Sande, L M , White, L R , Haraldseth, O , Unsgard, G , Assley, J , Sonnewald, U (1998), de nuestra autoria, *Dev Neurosci*, 20, 389-398 Los aminoácidos de cadena ramificada contribuyen con hidrógeno igualmente ya que pueden atravesar las barreras sangre-cerebrales y sangre-retinales eficientemente Hutson y sus colaboradores han propuesto que una lanzadera de nitrógeno entre las neuronas y la glia que consiste en aminoácidos de cadena ramificada y dos isoenzimas de BCAT, una en el citosol neuronal (BCATc) y una en la mitocondria glial (BCATm), también puede proporcionar también el nitrógeno necesario Hutson, S M , Berkich, D , Down, P , Xu, B , Aschner, M , y LaNoue, K F (1998) *J Neurochem* 71, 863-874 De acuerdo con esta lanzadera hipotética, la BCATc neuronal facilita la conversión por la BCATm glial del α-cetoglutarato en el glutamato proporcionando BCAA regenerado en las neuronas (cf Figura 1)

Como un primer paso hacia la investigación del rol de las isoenzimas de BCAT en la nueva síntesis del glutamato en la retina, se usó la inmunotransferencia con anticuerpos específicos de BCATm y BCATc para determinar si las isoenzimas de BCAT se expresan en la retina de las ratas Como se muestra

526
292 879

en la Figura 3, tanto la BCATc como la BCATm se expresan en la retina a niveles que son comparables con aquellos hallados en homogenatos de cerebro completo En consecuencia, la retina de rata recién disecada es un sistema neural intacto apropiado en para ensayar el concepto del lanzamiento de nitrógeno entre las neuronas y la glia

La gabapentina análoga de leucina (GBP) es una droga neuroactiva que inhibe la BCATc, pero no la BCATm Su, T -Z , Lunney, E , Campbell, G , Oxender, D L (1995) *J Neurochem* 64, 2125-2131 Se confirmó que la GBP inhibe la síntesis de la leucina en las retinas de rata recién disecadas (no se muestran datos) Se midio entonces el efecto de la GBP sobre la síntesis de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ en retinas de rata fuera del cuerpo vivo Como se muestra en la Figura 4, la GBP a 1 mM redujo la formación de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina al 71% de los valores de control (2,26 ± 0,05 contra 3,18 ± 0,12 nmol/mg, $p<0,001$) El agregado de 200 µM cada uno de leucina, isoleucina y valina invirtió la inhibición al 89% del control (2,84 ± 1,15 nmol/mg, $p<0,01$ comparada con la GBP sola) La GBP no tuvo ningun efecto sobre ATP ni sobre el fosfato de creatina, lo cual indica que la GBP no deterioro los procesos bioenergéticos retinales. El pequeño aumento en la incorporación de carbono 14 en los intermedios

del ciclo del lactato y del ácido cítrico (de 1,93 ± 0,06 a 2,12 ± 0,13) debido a que la presencia de GBP a 1 mM no era significativa La incorporación de la etiqueta en todos los metabolitos se muestra en la Tabla II

Se realizaron otros experimentos para investigar las propiedades de respuesta a la dosis de la GBP Las retinas recién disecadas se incubaron durante 20 minutos en el tampón A que contenía GBP a 0, 0,2, 1 o 5 mM Como se muestra en la Figura 5, el aumento de la concentración de la GBP en 1 mM no aumentó significativamente el grado de esta inhibición de la síntesis de ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ Nuevamente la GBP no tuvo ninguna influencia sobre la formación de intermedios de ciclo de ácido cítrico, lactato y piruvato (Figura 5) Esto apoya la propuesta de que el sitio de inhibición de GBP de la síntesis del glutamato es la conversión mediada por BCAT del α-cetoglutarato al glutamato

DISCUSIÓN

Los estudios descriptos evaluaron los mecanismos para mantener los niveles de glutamato en el sistema nervioso central Los estudios previos mostraron que la sintetasa de glutamina es requerida en las retinas y los cortes del hipocampo para

394 881 308

mantener los niveles de glutamato neuronal Su, F -Z , Lunney, E Campbell, G , Oxender, D L (1995) *J Neurochem* 64, 2125-2131

Las mediciones inmunocitoquímicas indican que el 90% o más del glutamato retinal y del cerebro completo es neuronal y que la inhibición de la sintetasa de glutamina para los 90 minutos agota la fuente de glutamato neuronal a niveles despreciables Ottersen, O P , Zhang, N , y Walberg, F (1992) *Neurosci* 46, 519-534 Esto demostro que la sintetasa de glutamina es requerida para mantener el glutamato neuronal Aunque el glutamato se puede sintetizar en las neuronas desde el α-cetoglutarato, la falta de carboxilasa de piruvato u otra enzima anaplerótica impide el reabastecimiento de α-cetoglutarato, y por lo tanto, impide la sintesis de glutamato neto dentro de las neuronas, salvo desde la glutamina a través de la glutaminasa

En este ejemplo, las fuentes y el control de la sintesis de la glutamina se investigo incubando retinas extirpadas con $H^{14}CO_3$ y midiendo la apariencia y la radioactividad especifica de la ^{14}C-glutamina y el ^{14}C-glutamato Se sintetiza más ^{14}C-glutamina en presencia de piruvato a 5 mM que en presencia de 0,2 mM Esto indica que la actividad de la carboxilasa de piruvato

795 59
882

influye en la velocidad de la síntesis de la glutamina Sin embargo, la sensibilidad de este control es demostrada por la observacion de que cuando el piruvato se incrementa de 0,2 mM a 5 mM, la magnitud del incremento en el flujo de la carboxilasa de piruvato (80,3%) no se traduce directamente en un aumento equivalente en el ^{14}C-glutamato más ^{14}C-glutamina (69,0%) La flexibilidad del control es provista por el potencial de descarboxilación del ciclo del ácido cítrico y el reciclado del piruvato La dependencia del piruvato de la fijación total de $H^{14}CO_3$ en el tejido retinal fue similar a la observada en los astrocitos aislados cultivados Gamberino, W C , Berkich, D A , Lynch, C J , Xu, B , y LaNoue, K F (1997) *J Neurochem* 69, 2312-2325 Sin embargo, en los astrocitos, que no tienen ningun modo de regenerar BCAA endógena usada para transaminar el α-cetoglutarato, los aumentos inducidos por el piruvato en la fijacion del CO_2 no se tradujeron en aumentos en los niveles de ^{14}C-glutamato y ^{14}C-glutamina En cambio, el carbono 14 se acumuló exclusivamente en los intermedios del ciclo de ácido cítrico y en el piruvato "reciclado"

En los estudios retinales informados aquí, la radioactividad específica de la glutamina en el estado estacionario fue 0,158 de la actividad específica del bicarbonato Como aproximadamente la mitad del ^{14}C incorporado en el oxalacetato

796-500
883

es retenida en el α-cetoglutarato, los resultados muestran que ≈32% de la glutamina deriva de $H^{14}CO_3$ Ésta es la primera estimación directa de la contribución de la anplerosis a la síntesis de la glutamina en un tejido neuronal Las estimaciones anteriores han sido indirectas, y consistieron en el analisis isotopomérico de los espectros de NMR posteriores a la infusión de ^{13}C glucosa (3-5, 11-13) en cerebros intactos Las estimaciones de la contribución de la carboxilación del piruvato a la síntesis de la glutamina usando estos métodos de NMR han sido menores que la presente, y están en la gama de menos del 1% (3) al 5%-10% (4,5) al 20%-25% Shank, R P , Bennet, G S , Freytag, S O y Campbell, G L (1985) *Brain Res* 329, 364-367, Griffen, J L , Rae, C , Radda, G K , y Matthews, P M (1999) *Biochim Biophys Acta* 1450, 297-307, lo cual depende en gran medida de las suposiciones iniciales de los modelos matemáticos usados Los presentes resultados sugieren que la carboxilación del piruvato glial y la conversión de los intermedios del ciclo del ácido cítrico al glutamato y la glutamina probablemente sean cuantitativamente importantes para la función retinal y posiblemente para la función cerebral completa

La observación de que la GBP hace más lenta la conversión de los intermedios del ciclo del acido cítrico en glutamina y

884

glutamato sugiere que la sintesis neuronal de la BCAA por la BCATc es necesaria para las velocidades óptimas de la aminación del α-cetoglutarato al glutamato Un esquema razonable para su participación en este proceso se muestra en la Figura 1

Los resultados, que demuestran la inhibición de la sintesis del ^{14}C-glutamato y la 14C-glutamina desde $H^{14}CO_3$ por la GBP y la inversión de la inhibición por la BCAA son consistentes con la lanzadera descipta La hipótesis también da una explicación para la acción antiepiléptica de la GBP Taylor, C P , Gee, N S , Welty, D F , Brown, J P , Dooley, D J , Boden, P , Singh, L (1998) *Epilepsy Res* 29, 233-249 De hecho, la sintesis del glutamato disminuida es una acción comun de la GBP y los inhibidores de la anhirasa carbónica antiepiléptica Hazen, S A , Waheed, A , Sly, W S , LaNoue, K F , Lynch, C J (1997) *Dev Neurosci* 19, 162-171 Tambien, la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce, la enfermedad hereditaria causada por una mutación del gen para la deshidrogenasa del cetoácido de cadena ramificada, si no es tratada induce una alta BCAA en suero en pacientes y consecuentes anormalidades neurológicas Chuang, D I , y Shih, V E (1995) en *La Base Metabólica de la Enfermedad Hereditaria*, eds Schriver, C R , Beaudet, A L , Sly, S , y Vaile, D (McGraw-Hill) páginas 1239-1277, que puede estar relacionada con la regulación anormal de la

885

síntesis del glutamato finalmente la implicación del lanzamiento del nitrógeno durante la síntesis del glutamato debe ser estudiada más profundamente a la luz de la eficacia de la GBP en el tratamiento de la enfermedad neuropática Ottersen, O P , Zhang, N y Walberg, F (1992) *Neurosci* 46, 519-534 y la neurodegeneración, Chuang, D I y Shih, V E (1995) en *La Base Metabólica de la Enfermedad Hereditaria*, eds Schriver, C R , Beaudet, A L , Sly, S y Valle, D (McGraw-Hill), paginas 1239-1277, Rothsetin J D y Kunel, R W (1995) *J Neurochem* 65, 643-651

EJEMPLO 67

Preparación de Enzimas Cerebros de rata congelados fueron fundidos en hielo y desmenuzados en trozos finos Para cada cerebro se agregaron 5 ml de un tampón isotónico [manitol a 225 mM sucrosa a 75 mM, MOPS a 5 mM (pH 7,1), EDTA a 1 mM, EGTA a 1 mM, DTT a 1 mM, que contenia leupeptina, pepstatina y PMSF] Las muestras se homogeneizaron en un homogeneizador de Potters (B Bran Biotech International) a 500 rpm durante diez pulsaciones, y luego diez pulsaciones adicionales a 800 rpm Los homogenatos se centrifugaron en el centrifugador Beckman J2-M1 con rotor JA-20 a 19 000 rpm durante 1 hora El sobrenadante se dializó con al menos tres cambios del tampón de diáfisis (manitol a 225 mM, sucrosa a 75 mM, MOPS a 5 mM a

pH 7,1, EDTA a 1 mM, LGTA a 1 mM, y DTT a 1 mM) durante 24 horas La enzima resultante se almaceno a -80°C para otros ensayos

Ensayo de la BCAT La reacción se realizó en tubos de Eppendorf de 1,5 ml en un volumen de 100 µl que contenía Tris-HCl a 50 mM (pH 8,3), [^{14}C]L-leucina a 25 µM, 2-oxoglutarato a 10 µM, fosfato de piridoxal a 15 µM, DTT a 1 mM, y enzima Las soluciones para la mezcla de la reacción se hicieron en diez veces las concentraciones Pasados 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (22°C), la reacción fue detenida agregando 100 µl de p-nitrofenil hidrazina a 15 mM en HCl a 2 M Pasados unos minutos se agrego 1 ml de un líquido de centelleo basado en tolueno (4,5 g de PPO y 0,5 g de bis-MSB en 1 litro de tolueno), se tapó el tubo y se mezcló completamente con un mezclador de Vortex Luego los tubos se centrifugaron a 13 500 rpm (centrifugador de Eppendorf 5415C) durante 10 minutos Se colocaron 600 µl de la capa orgánica de cada tubo en tubos de centelleo, y luego se agregaron 10 ml de cóctel de centelleo para el recuento

Ejemplo Número	rBCATc IC50 (µM)
1	146

887

2	1136
3	1660
4	2515
5	2934
6	2620
7	2165
8	74
9	120
10	121
11	-
12	-
13	-
14	-
15	-
16	-
17	-
18	-
19	-
20	-
21	-
22	389
23	2121
24	942
25	170

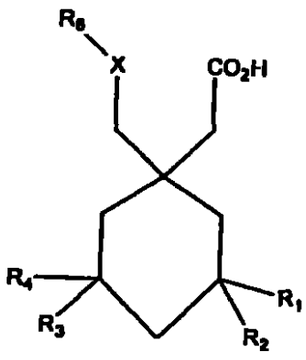
881 888

26	-
27	-
28	181
29	391
30	2250
31	908
32	243
33	1018
34	-
35	1768

802 - 556
889

REIVINDICACIONES

1 Un compuesto de la Fórmula IV



IV

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrógeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmacéuticamente aceptable de él

2 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son alquilo, R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es alquilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, X es O, R_6 es

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

803 890

alquilo R_6 es bencilo, R_6 es acetilo R_6 es fenialquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo, R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

3 Un compuesto de acuerdo con la reivindicacion 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrógeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R_4 son hidrógeno, R_1 es metilo y R_2-R_4 son hidrógeno, R_5 es hidrógeno, X es NR_6, R_6 es alquilo, R_6 es bencilo, R_6 es acetilo, R_6 es fenilalquilo, R_6 es cicloalquilo, R_6 es trifluoroalquilo, R_6 alquilcicloalquilo R_6 es alcoxi, y R_6 es alilo

4 Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_2 y R_4 son hidrogeno y R_1 y R_3 son metilo, R_1-R^4 son hidrógeno

5 Un compuesto de acuerdo con la reivindicacion 1, caracterizado porque se selecciona del grupo formado por

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

Ácido trans-((1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil)-acetico,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

306 354 892

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del acido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del acido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

SERGIO EL EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2639 Minjusticia 1 991

806 560
893

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

SERGIO EL EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

807 894

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del acido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusbcia 1 991

803 562 895

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

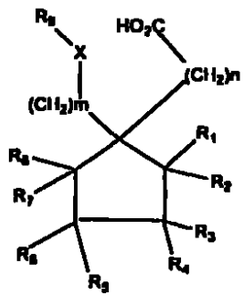
Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acetico;

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acetico, y

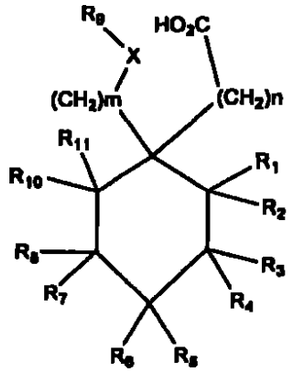
Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

6 Un método para tratar la retinopatía diabética, caracterizado porque comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las Fórmulas I, II y/o III, a un paciente que lo necesita

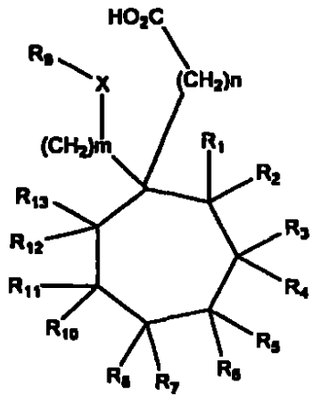
SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991



I



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halógeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2639 Minjusticia 1 991

810 564
897

alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un numero entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

X = NR_{14}, O, o S,

cuando hay más de un estereoisómero, cada centro quiral puede ser independientemente R o S, o una sal, éster, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

7 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H R_9 es alquilo, R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

8 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrogeno, m y n son 1, y X es O

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

911 898

9 El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el compuesto se selecciona del grupo formado por

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZ
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

871 566

899

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acetico,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

214 568
901

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acetico,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil]-acético,

Sal de cloıhidrato del ácido [1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil]-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

875 569
902

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil]-acetico

Sal de clorhidrato del ácido [1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acetico

Sal de clorhidrato del ácido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

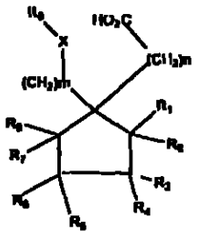
Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

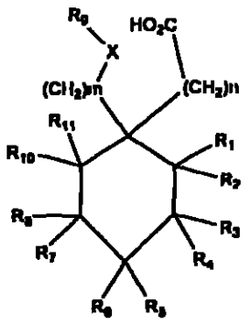
Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

10 Un método para inhibir la aminotransferasa dependiente de aminoácidos de cadena ramificada en un paciente que lo necesita, caracterizado porque comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de las Formulas I, II y/o III

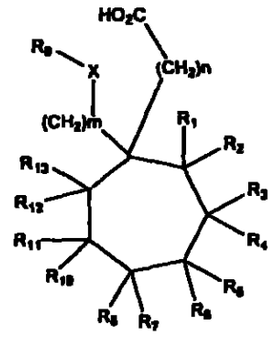
SERGIO EUTERIO CATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991



I



II



III

en donde

R_9 es H, alquilo, cicloalquilo, alquilo sustituido que contiene halogeno, amina, alcoxi, cicloalquilo, o hidroxi, alilo, alquinilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, sulfonilo, fenilo, bencilo, o arilalquilo,

m y n son independientemente un numero entero de 1 a 3,

R_1-R_4 y R_{10}-R_{14} son independientemente H, alquilo, o alquilo sustituido, y

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

X = NR_{14}, O, o S,

cuando hay más de un estereoisómero, cada centro quiral puede ser independientemente R o S, o una sal, éster, prodrogra, o amida farmacéuticamente aceptable de él

11 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque m y n son 1, X es NR_{14}, R_9 es H, R_4 es metilo, R_4 y R_5 son metilo, R_8 es metilo, R_{10} es metilo, R_7 y R_8 son metilo, R_4 y R_8 son metilo, R_1-R_8 y R_{10}-R_{13} son H, R_9 es alquilo, R_9 es bencilo, R_{14} es alquilo, R_9 es arilalquilo, R_9 es cicloalquilo, R_1-R_8 son H, R_1-R_8 y R_{10}-R_{11} son H, R_1-R_2 y R_7-R_8 son H, o R_2 es metilo

12 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque R_3 es alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{11} y R_{14} son hidrógeno, y m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, y X es NR_{14}, R_3 y R_{11} son alquilo, R_1-R_2 y R_4-R_{10} y R_{14} son hidrógeno, m y n son 1, R_9 es alquilo, y X es NR_{14}, y R_1-R_{11} y R_{14} son hidrogeno, m y n son 1, y X es O

13 El método de la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto se selecciona del grupo formado por

Ácido (1-alilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido (1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido {1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acéticó,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2639 Minjusticia 1 991

813 592
905

Ácido {1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-alilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(2,2,2-trifluoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-alilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-prop-2-inilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(2,2,2-trifuoro-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(3,3,3-trifluoro-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-{(1R,3R)-3-metil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{3,5-dimetil-1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Ácido 1α,3β,5β-{1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acetico,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZ
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

879 573
906

Ácido trans-{(1R,3R)-1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-3-metil-ciclohexil}-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-metilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-etilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-3-metil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-butilaminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido trans-((1R,3R)-1-hidroximetil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-(1-[(hidroximetil-1-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil}-acético,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dietil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido trans-(1R,3R)(1-Aminometil-3-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-2-metil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (1-aminometil-3,3-dimetil-ciclohexil)-acético,

Clorhidrato del ácido (±)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

907

Clorhidrato del ácido (cis/trans)-(3R)-(1-aminometil-3-metil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acético,

Clorhidrato del ácido (+)-(trans)-(1-aminometil-3,4-dimetil-ciclopentil)-acetico,

Clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-aminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-etilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-bencilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-dimetilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-butilaminometil-3,5-dimetil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-[(bencil-metil-amino)-metil]-3,5-dimetil-ciclohexil)-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-metilaminoetil-ciclohexil)-acético,

Ácido 1α,3β,5β-[1-(acetilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

525
908

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(1-(isobutilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-[3,5-dimetil-1-(fenetilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido 1α,3β,5β-(3,5-dimetil-1-[(3-fenil-propilamino)-metil]-ciclohexil}-acetico,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(ciclobutil-amino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del acido 1α,3β,5β-(1-(isopropilamino-metil)-3,5-dimetil-ciclohexil]-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclohexano-acético,

Ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-aminometil-1-ciclopentano-acético,

Sal de sodio del ácido 1-(hidroximetil)ciclohexano-acetico,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-metil-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del acido {1-[(4,4,4-trifluoro-butilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-etilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(ciclopropilmetil-amino)-metil]-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido {1-[(2-hidroxi-1-metil-etilamino)-metil]-ciclohexil}-acético,

SERGIO ELEUTERIO CATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

909

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isobutilamino-metil)-ciclohexil]-acético

Sal de clorhidrato del acido (1-propilaminometil-ciclohexil)-acético,

Sal de clorhidrato del ácido [1-(isopropilamino-metil)-ciclohexil]-acético,

Sal de clorhidrato del ácido (1-ciclohexilaminometil-ciclohexil)-acético, y

Sal de clorhidrato del ácido [1-(bencilamino-metil)-ciclohexil]-acético

14 Un método para tratar trastornos neurológicos, depresión, ansiedad, pánico, manias, trastornos bipolares, enfermedades antiinflamatorias, glaucoma, dolor o lesión gastrointestinal, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula IV a un paciente que lo necesita

R_1-R_4 son hidrógeno o alquilo,

X es NR_5 u O,

R_5 es hidrógeno o alquilo,

R_6 es hidrogeno, alquilo, bencilo, alcanoilo, alcoxialcanoilo, arilalquilo, alcoxi, cicloalquilo, alilo, alquilcicloalquilo, halogenalquilo trisustituido y en donde R_1-R_4 son cada uno hidrógeno, entonces R_6 no es hidrógeno o metilo, o una sal, éster, prodroga o amida farmacéuticamente aceptable de él

SERGIO EUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

823 577
910

RESUMEN DE LA INVENCION

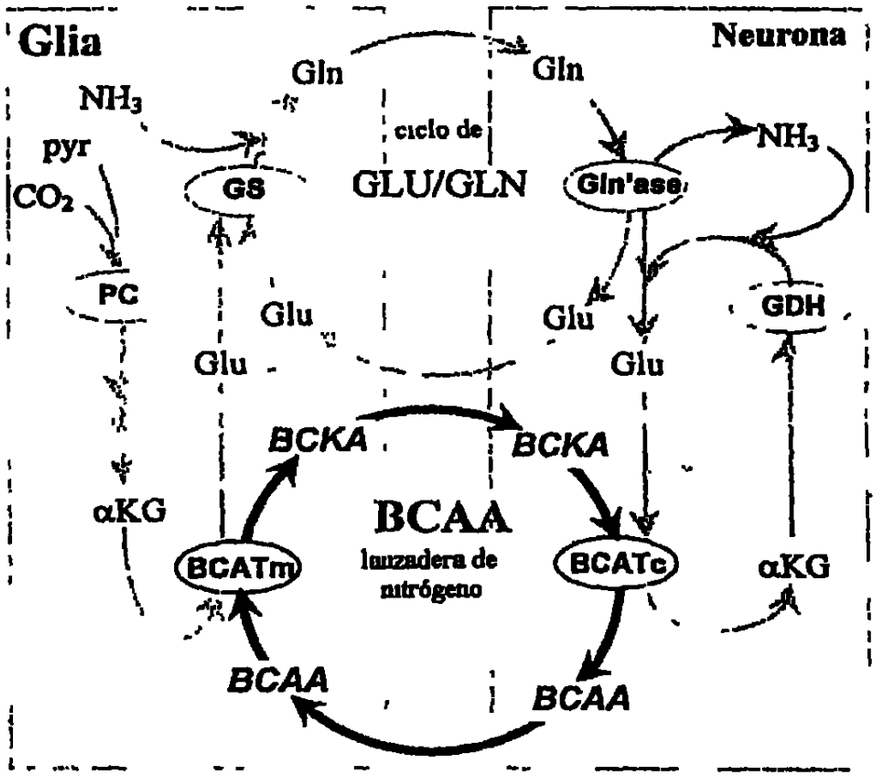
La presente invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y terapeutico de la retinopatia diabética El método consiste en la administración de un inhibidor de la via de la aminotransferasa dependiente de aminoacidos de cadena ramificada (BCAT), a un animal, tal como un mamifero, en particular un humano, en una cantidad suficiente para tratar profiláctica o terapéuticamente la retinopatia diabética La presente invencion también se refiere a varios inhidores novedosos de la vía de la BCAT ----

---

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

824 598
911

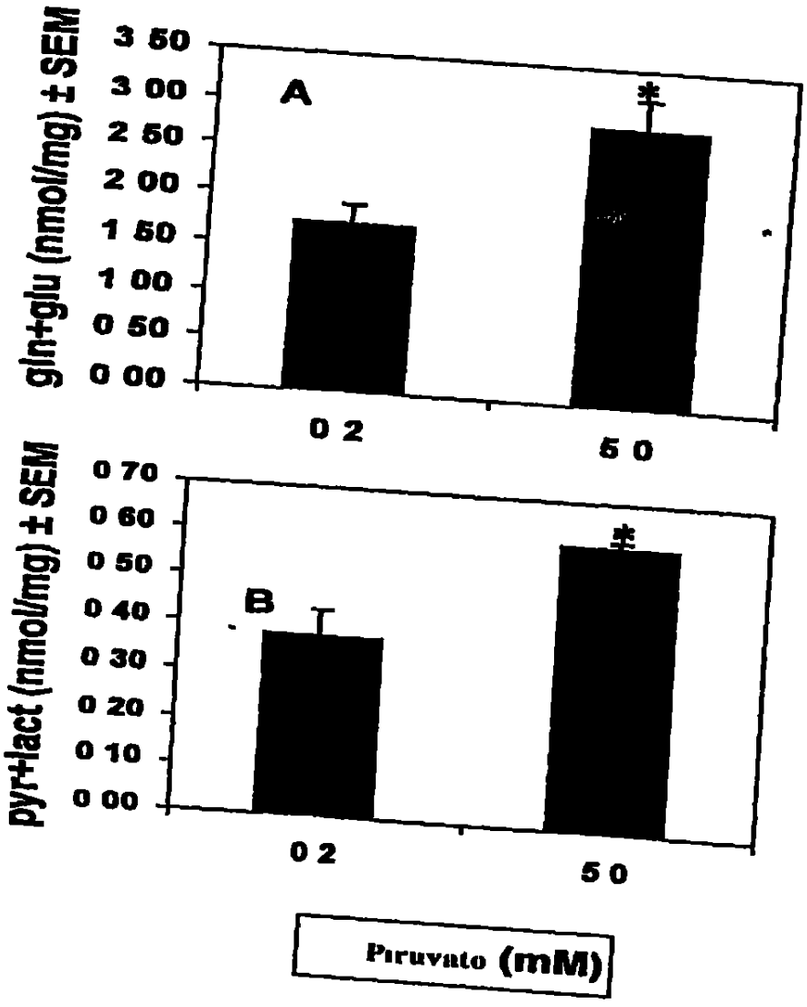
Figura 1



SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

912

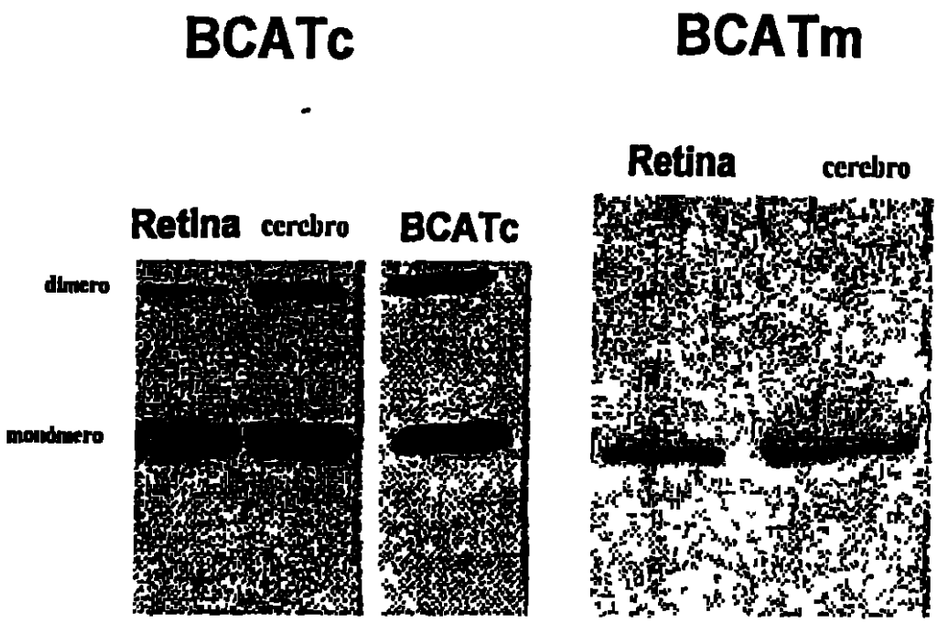
Figura 2



SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDI
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

826 520
913

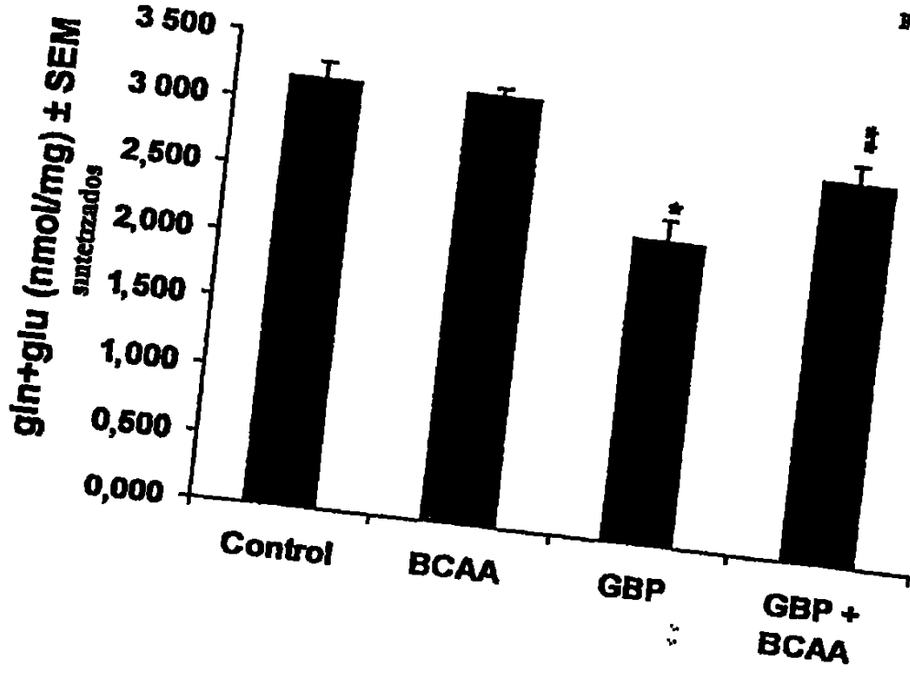
Figura 3



SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

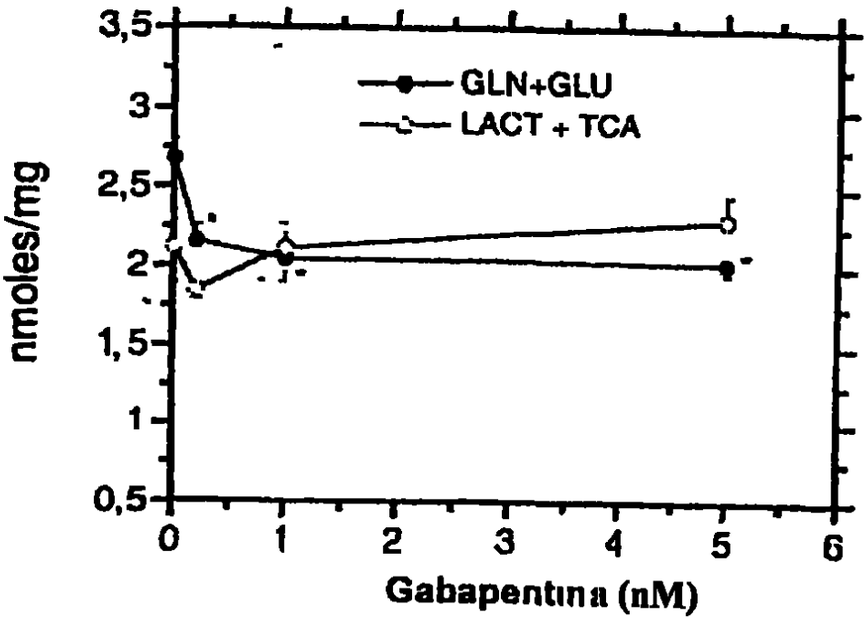
914

Figura 4



SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol. No 2839 Minjusticia 1 991

Figura 5



EL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL HA REVISADO LA TRADUCCION DE LAS REIVINDICACIONES DE ESTE DOCUMENTO Y ESTA CORRECTA

ESTE DOCUMENTO FUE LEGALIZADO BAJO EL No 493963 DE DICIEMBRE 15 DEL 2000 ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO
2000 DEC 18 A 8:59
JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA
Traductor e Intérprete Oficial
Resol No 2839 Minjusticia 1 991

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
28 DIC 18
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

ACCION Consultar Siguiente Anterior Primero Ultimo Salir
Ver el Siguiente Registro

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO SISTEMA DE TRAMITES
Fecha 10/03/2006

CONSULTA RADICACION TRAMITES DIAS ANTERIORES

No radicacion 0 93679 0 Sec_eve 0 Sec_act 8

Tramite 2 PATENTES DE INVENCION
Evento 1 REGISTRO/DEPOSITO/CONCESION/DEPOSITO
Actuacion 538 PETICION DE EXAMEN
Dep Origen
Dep Destino 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Solicit/Destinat MAYA RODRIGUEZ CARLOS
Tipo Documento 1 CARTA Fecha 10/10/2003
Folios 2
Fecha radicacion 2003-10-10 11 38 53 Tipo Radicacion EN
Observaciones

Encontrados (10/10) registro(s)

917

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No **00- 93679**

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**

FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **528**, DE

FECHA **30** DE **MAYO** DE **2003**, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY

EXPIRA EL **29** DE **AGOSTO** DE **2003**

NOTA Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS

SI _____ NO ___X____