

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-036338- -00001-0000

Fecha: 2010-04-06 16:34:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 54

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-GLAXOSMITHKLINE LLC.-Solicitud de Patente de Invención en
Fase Nacional PCT para "COMPUESTO INHIBIDOR DE
GLICÓGENO FOSFORILASA Y COMPOSICIÓN
FARMACÉUTICA DEL MISMO".-Clase C07C 275/34.-
Expediente número 10-036.338.-

1. Me refiero a mi Solicitud de Patente de 26 de Marzo de 2010.
2. Por medio del presente memorial y debidamente autorizado por mi representado, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar en forma voluntaria unas leves correcciones de tipo tipográfico al capítulo descriptivo que reemplaza al originalmente presentado y en el que se han realizado los siguientes cambios:

- (a) En la página 14, línea 14, se eliminó el paréntesis;
- (b) En la página 15, línea 8, se eliminó el paréntesis;
- (c) En la página 26, línea 5, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (d) En la página 26, línea 17, página 27, línea 3, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (e) En la página 27, línea 18, página 28, línea 10, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (f) En la página 29, línea 20, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (g) En la página 30, línea 11, se cambió DMSO-d₆ por DMSO-d₆;
- (h) En la página 31, línea 3, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (i) En la página 32, línea 9, se cambió DMSO-D6 por DMSO-d₆;
- (j) En la página 33, línea 13, se cambió DMSO-d₆ por DMSO-d₆;

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

- (k) En la página 34, línea 21, se cambió DMSO- d_6 por DMSO- d_6 ;
- (l) En la página 36, línea 11, se cambió DMSO- d_6 por DMSO- d_6 ;
- (m) En la página 39, línea 7, se cambió DMSO- d_6 por DMSO- d_6 ;
- (n) En la página 40, línea 2, se cambió DMSO- d_6 por DMSO- d_6 ; y
- (o) En la página 41, línea 8, y página 42, línea 9, se cambió DMSO- d_s por DMSO- d_6 y D por δ ;

Sobre este particular, finalmente me permito manifestar que las modificaciones realizadas al capítulo descriptivo en mención **no amplían de manera alguna el alcance de la invención tal como fue originalmente presentada** y que el nuevo capítulo modificado es el que debe ser tenido en cuenta en el tramite de Fase Nacional.

3. Anexo me permito presentar:

- (a) Formulario único de correcciones y modificaciones;
- (b) Recibo número 10-7,707 expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acreditan el pago de las modificaciones mencionadas; y
- (c) Copia de las páginas 1 a 51 del nuevo capítulo descriptivo que reemplaza al documento originalmente presentado con mi solicitud de patente radicada el 26 de Marzo de 2010, en el cual se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente.

4. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P.53.215

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES.
2000-10

①

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material.

☒

Modificación a una Solicitud.

②

SOLICITANTE

Nombre: GLAXOSMITHKLINE LLC.

Dirección: One Franklin Plaza, 200 North 16th Street,
Philadelphia, Pennsylvania 19102, Estados Unidos de
América.

Teléfono: 3 264270

Fax: 6 069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

Domicilio: Philadelphia, Estado de Pennsylvania,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACION

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: ALICIA LLOPEDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 5º Piso

Teléfono: 3 264270

Fax: 6 069701

E-mail: jlloco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.690.713 TP 53.215

④

Número de expediente:

10-036.338

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada Modificación al capítulo descriptivo.

⑥

Comprobante de pago No. 10-7.707

Fecha 01-02-2010

⑦

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes, si fuere el caso

☐

Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALICIA LLOPEDA RICAURTE

FIRMA



C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

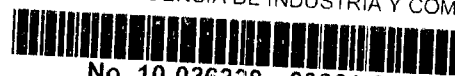
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 7,707
FECHA : FEBRERO 1 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-036338- -00001-0000

Fecha: 2010-04-06 16:34:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 54

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754307	36907942	01/02/2010	11,717,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	114,000.00
		TOTAL :	\$ 114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COMPUESTO INHIBIDOR DE GLICÓGENO FOSFORILASA Y
COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DEL MISMO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La invención se refiere a un novedoso compuesto, el cual es un inhibidor de glicógeno fosforilasa y su uso en el tratamiento de diabetes y otras condiciones asociadas con el mismo. La invención además se refiere a una composición farmacéutica que contiene el
10 compuesto y a procesos para preparar el compuesto y la composición farmacéutica.

15

20

25

COMPUESTO INHIBIDOR DE GLICOGENO FOSFORILASA Y
COMPOSICION FARMACEUTICA DEL MISMO

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto inhibidor de glicógeno fosforilasa, una composición farmacéutica del compuesto, el uso del compuesto o composición farmacéutica conteniéndolo en el tratamiento de diabetes, condiciones asociadas con diabetes, y/o isquemia de tejido, incluyendo isquemia miocárdica, y un proceso
10 para hacer el compuesto.

Antecedentes de la invención

 El tratamiento de diabetes permanece como una preocupación de salud en la mayoría del mundo. Medicamentos oralmente
15 ingeridos teniendo efectos laterales indeseables mínimos son deseados sobre la auto-inyección de insulina. Existe una necesidad continua de medicamentos que sean mejores, que tengan menores efectos laterales, de acción más larga, o actúen vía diferentes mecanismos.

20 Una variedad de medicamentos están disponibles para el tratamiento de diabetes. Estos incluyen insulina inyectada y medicamentos, tales como sulfonilureas, glipizida, tobutamida, acetohexamida, tolazimida, biguanidas y metformina (glucófago), los cuales son ingeridos oralmente. La auto-inyección de insulina es
25 requerida en pacientes diabéticos en los cuales los medicamentos

oralmente ingeridos no son efectivos. Los pacientes teniendo diabetes Tipo 1 (también referida como diabetes mellitus dependiente de insulina) son usualmente tratados mediante auto-inyección de insulina. Los pacientes que sufren de diabetes Tipo 2
5 (también referida como diabetes mellitus no dependiente de insulina) son usualmente tratados con una combinación de dieta, ejercicio y un agente oral. Cuando los agentes orales fallan, la insulina puede ser prescrita. Cuando los medicamentos diabéticos son tomados oralmente, usualmente se refieren múltiples dosificaciones diarias
10 con frecuencia.

La determinación de la dosificación apropiada de insulina requiere la prueba frecuente del nivel de azúcar en la orina y/o sangre del paciente. La administración de un exceso de dosis de insulina generalmente provoca hipoglicemia, la cual tiene síntomas
15 que varían desde anormalidades suaves en glucosa en sangre hasta coma, o incluso la muerte. Los medicamentos oralmente ingeridos no están, de igual manera, sin efectos laterales indeseables. Por ejemplo, tales medicamentos pueden ser inefectivos en algunos pacientes y provocar alteraciones gastrointestinales o deteriorar la
20 función apropiada del hígado en otros individuos. Siempre existe la necesidad de medicamentos mejorados teniendo menos efectos laterales y/o unos que tengan éxito donde otros fallan.

En la diabetes mellitus Tipo 2 o no dependiente de insulina, la producción de glucosa hepática es un objetivo importante. El hígado
25 es el principal regulador de los niveles de glucosa en plasma en el

estado en ayuno. La velocidad de producción de glucosa hepática en los pacientes Tipo 2 es normalmente elevada de manera significativa cuando se compara con individuos no diabéticos. Para diabéticos Tipo 2, en el estado alimentado o postprandial, el hígado
5 tiene un papel proporcionalmente más pequeño en el suministro de glucosa en plasma total y la producción de glucosa hepática es anormalmente alta.

El hígado produce glucosa mediante glicogenólisis (descomposición del glicógeno de polímero de glucosa) y
10 gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de precursores de 2 y 3 carbonos). Por lo tanto, la glicogenólisis es un objetivo importante para la interrupción de producción de glucosa hepática. Existe alguna evidencia que sugiere que la glicogenólisis puede contribuir en el rendimiento de glucosa hepática inapropiado en los pacientes
15 diabéticos Tipo 2. Los individuos teniendo enfermedades de almacenamiento de glicógeno de hígado, tal como enfermedad de Hers o deficiencia de glicógeno fosforilasa frecuentemente exhiben hipoglicemia episódica. Adicionalmente, en humanos de post-absorción normal, hasta aproximadamente 75% de la producción de
20 glucosa hepática es estimada por resultar de la glicogenólisis.

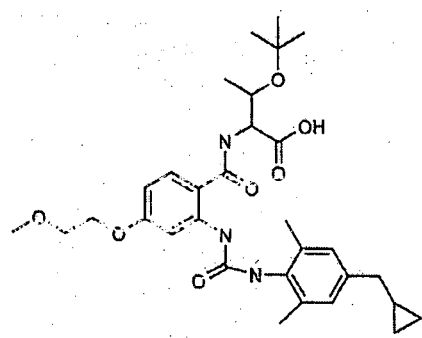
La glicogenólisis es realizada en hígado, músculo y cerebro mediante isoformas de tejido específico de la enzima glicógeno fosforilasa. Esta enzima corta la macromolécula de glicógeno para liberar glucosa-1-fosfato y una macromolécula de glicógeno
25 acortada.

Los inhibidores de glicógeno fosforilasa incluyen glucosa y sus análogos, cafeína y otros análogos de purina, aminas cíclicas con varios substituyentes, acil ureas y compuestos similares a indol. Estos compuestos e inhibidores de glicógeno fosforilasa, en general, han sido postulados por ser de uso potencial en el tratamiento de diabetes Tipo 2 al disminuir la producción de glucosa hepática y disminuir la glicemia. Adicionalmente, se cree deseable que un inhibidor de glicógeno fosforilasa sea sensible a concentraciones de glucosa en sangre.

De acuerdo con esto, lo que se desea es un nuevo compuesto y composición farmacéutica conteniéndolo para el tratamiento de diabetes y/o condiciones asociadas con la diabetes.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I,



Fórmula I

sal, solvato o derivado funcional fisiológico del mismo.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado

fisiológicamente funcional del mismo.

Además, se proporciona una composición farmacéutica comprendiendo un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo y uno o más excipientes.

- 5 Todavía se proporciona además un método de tratamiento que comprende administrar a un mamífero, en particular un humano, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I, sal farmacéuticamente aceptable, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo y al menos un excipiente, en
10 donde dicho tratamiento es para una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste de diabetes, condiciones asociadas con diabetes e isquemia de tejido, incluyendo isquemia miocárdica.

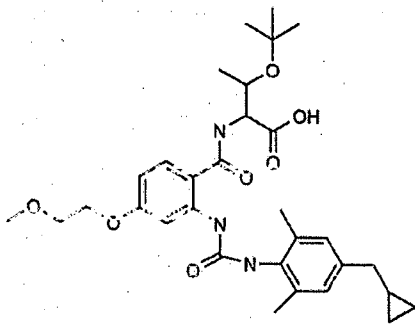
- Adicionalmente, se proporciona un compuesto de Fórmula I,
15 sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo para usarse como una sustancia terapéutica activa (en terapia). También se proporciona un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo para usarse en el tratamiento de diabetes, condiciones asociadas con diabetes y/o
20 isquemia de tejido, incluyendo isquemia miocárdica en un mamífero, especialmente un humano.

Un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo también es provisto.

Descripción detallada de la invención

La actividad de glicógeno fosforilasa en tejido muscular es importante para la generación de glucosa y subsecuentemente demanda de energía. La inhibición de glicógeno fosforilasa de músculo en el momento del ejercicio puede conducir a debilidad muscular y daño de tejido muscular. Por lo tanto, puede ser deseable tener el compuesto de la presente invención, el cual muestre un mayor efecto sobre glicógeno fosforilasa en el hígado como se compara con el músculo cuando se da oralmente a mamíferos. El compuesto de la presente invención muestra un fuerte efecto sobre el contenido de glicógeno de hígado con poco efecto sobre el contenido de glicógeno de músculo y función posterior una dosis oral. En consecuencia, el compuesto de la presente invención podría exhibir una potente actividad in vivo, tener propiedades de solubilidad y biodisponibilidad aceptables, así como tener un perfil de seguridad/toxicidad mejorado en vista de su selectividad para tejido de hígado.

La presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I



Fórmula I

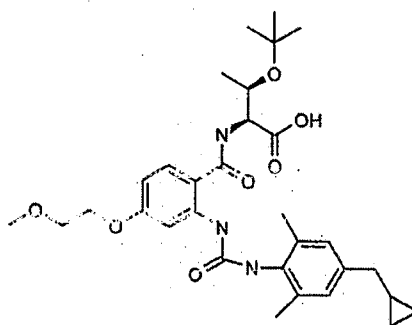
sal, solvato o derivado funcional fisiológico del mismo. El nombre químico para un compuesto de Fórmula I es N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino]carbonil]amino]-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]fenil)carbonil]-O-(1,1,-dimetiletil)treonina.

5 El compuesto de Fórmula I o una sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo puede existir en formas estereoisoméricas (por ejemplo, contiene uno o más átomos de carbono asimétricos). Los estereoisómeros individuales (enantiómeros y diastereómeros) y mezclas de estos son incluidos
10 dentro del alcance de la presente invención. La invención también cubre los isómeros individuales del compuesto (sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional) representado por la Fórmula I como mezclas con isómeros de los mismos, en los cuales son invertidos uno o más centros quirales. De igual manera, se entiende
15 que un compuesto (sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional) de Fórmula I, puede existir en formas tautoméricas diferentes a aquéllas mostradas en la fórmula y éstas también son incluidas dentro del alcance de la presente invención. Se entenderá que la presente invención incluye todas las combinaciones y
20 subconjuntos de los grupos particulares definidos antes en la presente. El alcance de la presente invención incluye mezclas de estereoisómeros así como enantiómeros purificados o mezclas enantiomérica/diastereoméricamente enriquecidas. También se encuentran dentro del alcance de la invención los isómeros
25 individuales del compuesto representado por la fórmula I, así como

cualquier mezcla completa o parcialmente equilibrada. La presente invención también incluye los isómeros individuales del compuesto, sal, solvato o derivado representado por la fórmula así como mezclas con isómeros de los mismos, en los cuales uno o más centros
5 quirales son invertidos. Se entenderá que la presente invención incluye todas las combinaciones y subconjuntos de los grupos particulares definidos antes en la presente.

La estereoquímica preferida del compuesto es mostrada en la Fórmula IA a continuación:

10



15

Fórmula IA

Aquéllos expertos en la técnica apreciarán que el compuesto de la presente invención también puede ser utilizado en la forma de
20 una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o derivado fisiológicamente funcional del mismo.

Normalmente, pero no de manera absoluta, las sales de la presente invención son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales abarcadas dentro del término "sales farmacéuticamente
25 aceptables" se refieren a sales no tóxicas del compuesto de la

invención. Las sales del compuesto de la presente invención pueden incluir sales convencionales formadas a partir de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, 5 litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, cinc, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaina.

Como se usa en la presente, el término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría formado por un soluto (en esta 10 invención, un compuesto de Fórmula I, sal o derivado fisiológicamente funciona del mismo) y un solvente. Tales solventes, para el propósito de la invención, pueden no interferir con la actividad biológica del soluto. Ejemplos no limitantes de solventes adecuados incluyen, pero no están limitados a agua, metanol, etanol 15 y ácido acético. De preferencia, el solvente usado es un solvente farmacéuticamente aceptable. Muy preferiblemente, el solvente usado es agua y el solvato es un hidrato.

Como se usa en la presente, el término "derivado fisiológicamente funcional" se refiere a cualquier derivado 20 farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la presente invención que, sobre administración a un mamífero, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto de la presente invención o un metabolito activo del mismo. Tales derivados, por ejemplo, ésteres y amidas, estarán claros para aquéllos expertos en 25 la técnica, sin experimentación indebida. Puede hacerse referencia

a la enseñanza de Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (Química medicinal y descubrimiento de medicamento de Burger), 5ª edición, Volume 1: Principles and Practice (Volumen 1: Principios y práctica), el cual es incorporado en la presente por referencia al
5 grado que muestra derivados fisiológicamente funcionales.

Los procesos para preparar sales farmacéuticamente aceptables, solvatos y derivados fisiológicamente funcionales del compuesto de Fórmula I son generalmente conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery
10 (Química medicinal y descubrimiento de medicamento de Burger), 5ª edición, Volume 1: Principles and Practice (Volumen 1: Principios y práctica).

El compuesto (sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional) de Fórmula I puede ser preparado convenientemente
15 mediante el proceso señalado más adelante. El orden de los pasos anteriores no es crítico para la práctica de la invención y el proceso puede ser practicado al realizar los pasos en cualquier orden adecuado con base en el conocimiento de aquéllos expertos en la técnica. Además, algunos de los pasos descritos pueden ser
20 combinados con el aislamiento de todos los compuestos intermedios.

Un método general de la síntesis del compuesto de Fórmula I es señalado en el Esquema 1 a continuación. El ácido 4-fluoro-2-nitrobenzoico de inicio (2) puede ser convertido al éster de metoxietilo bajo condiciones estándares, tal como tratamiento con 2-
25 bromoetil metil éter y una base, tal como carbonato de potasio en un

solvente polar, tal como DMF o NMP. El grupo fluoro puede ser desplazado con 2-metoxietanol bajo condiciones básicas, tal como carbonato de potasio en DMF o NMP. El éster puede ser removido entonces bajo condiciones básicas tales como hidróxido de litio o
5 hidróxido de sodio en solventes, los cuales incluyen tetrahidrofuran (THF) y/o metanol (MeOH) y/o agua y/o 1,4-dioxano para dar el Intermediario 3.

El Intermediario 5 es formado al mezclar el intermediario 3 con O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de metilo (4) o su sal de hidrocloreto
10 bajo condiciones de acoplamiento estándares. Estas condiciones incluyen, pero no están limitadas a, el uso de EDC (hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), PyBop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio), HOBT (N-hidroxibenzotriazol), HOAT (N-hidroxi-9-azabenzotriazol), o
15 DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), o HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) y DIEA (N,N-diisopropiletilamina) o trietilamina a temperatura ambiente. Los solventes que pueden ser usados incluyen DMSO, NMP o de preferencia DMF. Además, combinar 3 y 4 en acetato de etilo en la
20 presencia de anhídrido cíclico de ácido 1-propanofosfónico y una base orgánica, tal como DIEA o trietilamina producirá el intermediario 5. En un método preferido, 3 es convertido en el cloruro de ácido correspondiente bajo condiciones estándares tal como tratamiento con cloruro de oxalilo en un solvente, tal como
25 diclorometano, en la presencia de una cantidad catalítica de DMF.

La reacción del cloruro de ácido resultante con *O*-(1,1-dimetiletil)-*L*-treoninato de metilo (4) o su sal de hidrocloreuro en la presencia de una base orgánica, tal como DIEA o trietilamina en un solvente tal como acetonitrilo, produce el intermediario 5.

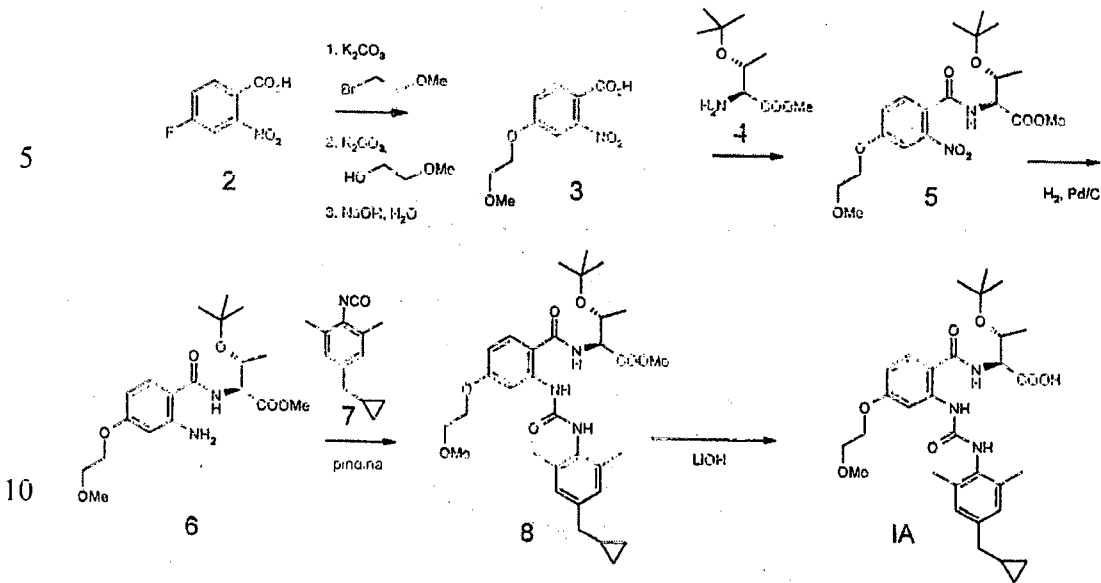
5 La reducción del grupo nitro de 5 bajo condiciones estándares tales como, pero no limitadas a, tratamiento con paladio sobre carbono bajo una atmósfera de hidrógeno en un solvente, tal como acetato de etilo o metanol produce el intermediario 6.

 El intermediario 6 es formado al mezclar el intermediario 6 con
10 el isocianato; el intermediario 7 (método de síntesis señalado más adelante, ver Esquema 3) y diisopropiletilamina (DIEA) o trietilamina, en un solvente tal como DMF. De preferencia, los intermediarios 6 y 7 son combinados en piridina par dar el intermediario 8.

 El producto final es formado mediante corte del éster de
15 intermediario 8 bajo condiciones básicas, tal como hidróxido de litio o hidróxido de sodio en solventes, los cuales incluyen tetrahidrofurano (THF) y/o metanol (MeOH) y/o agua y/o 1,4-dioxano.

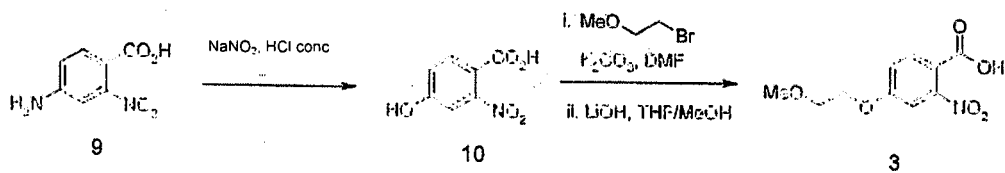
95

Esquema 1: Síntesis de un compuesto de Fórmula I.



De manera alternativa, para sintetizar otros isómeros o racematos de Fórmula I, un diferente isómero de 4 puede ser substituido. Una ruta alterna para el intermediario 3 es mostrada en el Esquema 2 a continuación. El intermediario 9 es convertido al fenol, intermediario 10, mediante tratamiento con nitrito de sodio y ácido clorhídrico. El intermediario 3 es preparado entonces mediante reacción de intermediario 10 con 2-bromoetil metil éter bajo condiciones básicas, tales como carbonato de potasio en DMF, seguido por tratamiento con hidróxido de litio o hidróxido de sodio en solventes, los cuales incluyen tetrahidrofurano (THF) y/o metanol (MeOH) y/o agua y/o 1,4-dioxano.

Esquema 2: Método alternativo de la Síntesis de intermediario 3



5

Un método general de la síntesis del intermediario 7 es señalado en el Esquema 3 a continuación. El tratamiento de la 4-bromo-2,6-dimetilanilina comercialmente disponible 11 con reactivo Vilsmeier (cloruro de ((clorometilen)dimetiliminio, o generación in situ a partir de DMF y cloruro de oxalilo) en un solvente, tal como diclorometano, dará el intermediario 12. La reacción de intermediario 12 con una base fuerte tal como n-butil litio a baja temperatura en un solvente tal como THF seguido por tratamiento con ciclopropanocarbaldehído produce el intermediario 13.

El intermediario 14 es formado mediante tratamiento de intermediario 13 con hidróxido de litio en etanolamina en reflujo seguido por tratamiento con hidróxido de litio en alcohol isopropílico y agua.

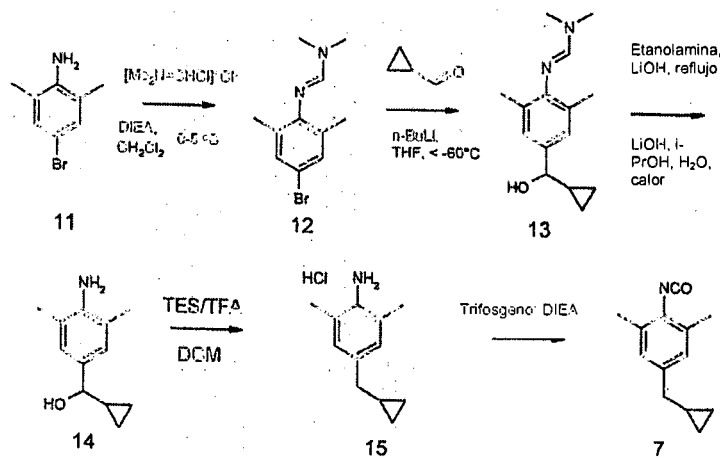
La reducción de intermediario 14 para dar intermediario 15 puede ser realizada mediante tratamiento de intermediario 14 con trietilsilano y ácido trifluoroacético. En un método alternativo, el hidroxilo bencílico de intermediario 13 puede ser reducido mediante tratamiento con complejo de borano THF y dietil eterato de trifluoruro de boro en THF. El compuesto de metileno resultante es tratado entonces con hidróxido de litio, hidracina, en etanol y agua con

25

calentamiento para dar el intermediario 15.

El intermediario 7 es obtenido entonces mediante tratamiento del intermediario 15 con fosgeno o trifosgeno y una base al como DIEA en un solvente tal como diclorometano.

Esquema 3: Síntesis del intermediario 7.



La invención proporciona además una composición farmacéutica (también referida como formulación farmacéutica) que comprende un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo y uno o más excipientes (también referidos como portadores y/o diluyentes en las artes farmacéuticas). Los excipientes son aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales al receptor de la misma (es decir, el paciente).

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar (o combinar) un compuesto de Fórmula I, sal,

solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo con al menos un excipiente.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosis de unidad conteniendo una cantidad predeterminada de ingrediente activo por dosis de unidad. Tal unidad puede contener una dosis terapéuticamente efectiva del compuesto de Fórmula I, al, solvato derivado fisiológicamente funcional del mismo o una fracción de una dosis terapéuticamente efectiva, de manera que formas de dosificación de unidad múltiple pudieran ser administradas a un momento dado para alcanzar la dosis terapéuticamente efectiva deseada. Las formulaciones de dosificación de unidad preferidas son aquélla conteniendo una dosis diaria o sub-dosis, como se declara antes en la presente, o una fracción apropiada de la misma, de un ingrediente activo. Adicionalmente tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser adaptadas para la administración mediante cualquier ruta apropiada, por ejemplo, mediante ruta oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales composiciones pueden ser preparadas mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, al puentear en asociación con el ingrediente activo con el o los excipientes.

Cuando se adaptan para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en unidades discretas, tales como tabletas o cápsulas; polvos gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o batidos; 5 emulsiones líquidas aceite-en-agua o emulsiones líquidas agua-en-aceite. El compuesto (sal, solvato o derivado) de la invención o composición farmacéutica de la invención también puede ser incorporado en un dulce, una galleta y/o formulación de cinta para lengua para la administración como medicina "de disolución rápida".

10 Por ejemplo, para administración oral en la forma de una tableta o cápsula, el componente de medicamento activo puede combinarse con un portador inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral, tal como etanol, glicerol, agua y similar. Los polvos o gránulos son preparados al triturar el compuesto a un tamaño fino 15 adecuado y mezclar con un portador farmacéutico triturado de manea similar, tal como un carbohidrato comestible como por ejemplo, almidón o manitol. También pueden estar presentes agentes saborizantes, conservadores, dispersantes y colorantes.

Las cápsulas se hacen al preparar una mezcla de polvo, como 20 se describe antes, y llenar estuches no gelatinosos o de gelatina formados. Los deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, polietilenglicol sólido, pueden ser adicionados a la mezcla de polvo antes de la operación de llenado. Un agente desintegrador o solubilizante, tal 25 como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio, también

puede adicionarse para mejorar la disponibilidad de la medicina cuando la cápsula es ingerida.

Más aún, cuando se desee o sea necesario, ligantes, lubricantes, agentes desintegradores y agentes colorantes adecuados también pueden ser incorporados en la mezcla. Los ligantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, endulzantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los desintegradores incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Las tabletas son formuladas, por ejemplo, al preparar una mezcla de polvo, granular o balín, adicionar un lubricante y desintegrador, y presionar en tabletas. Una mezcla de polvo es preparada al mezclar el compuesto, adecuadamente triturado, con un diluyente o base como se describe antes, y de manera opcional, con un ligante tal como carboximetilcelulosa, y alginato, gelatina o polivinil pirrolidona, un retardante de solución tal como parafina, un acelerador de resorción, tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción, tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo puede ser granulada al humectar un ligante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia, o soluciones de

fol

materiales celulósicos o poliméricos y forzarlos a través de un tamiz. Como una alternativa a granular, la mezcla de polvo puede correrse a través de la máquina tableteadora y el resultado son balines imperfectamente formados rotos en gránulos. Los gránulos pueden
5 ser lubricados para prevenir que se peguen a los dados formadores de tabletas por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada es comprimida entonces en tabletas. El compuesto (sal, solvato o derivado) de la presente invención también puede combinarse con un portador inerte
10 que fluye libre y comprimirse en tabletas directamente sin pasar a través de los pasos de granulado o balín. Un recubrimiento protector opaco claro que consiste de un recubrimiento de sellado de laca, un recubrimiento de azúcar, o material polimérico, y un recubrimiento de pulido de cera puede ser provisto. Los colorantes pueden ser
15 adicionados a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones.

Los fluidos orales, tales como soluciones, jarabes y elixires pueden prepararse en formas de unidad de dosificación de manera que una cantidad da contenga una cantidad predeterminada de
20 ingrediente activo. Los jarabes pueden ser preparados al disolver el compuesto (sal, solvato o derivado) de la invención en una solución acuosa adecuadamente saborizada, mientras que los elixires son preparados a través del uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden ser formuladas al dispersar el compuesto (sal,
25 solvato o derivado) de la invención en un vehículo no tóxico. Los

solubilizantes y emulsificantes, tales como alcoholes de isoestearilo etoxilados y éteres de polioxietilen sorbitol, conservadores, aditivos de sabor tales como aceite de menta, endulzantes naturales, sacarina u otros endulzantes artificiales y similares, también pueden
5 ser adicionados.

Donde es apropiado, las formulaciones de unidad de dosificación para administración oral pueden ser microencapsuladas. La formulación también puede ser preparada para prolongar o sostener la liberación como, por ejemplo, al recubrir o incrustar
10 material particulado en polímeros, cera o similares.

En la presente invención, las tabletas y cápsulas son preferidas para entrega de la composición farmacéutica.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" incluye la profilaxis y se refiere a aliviar la condición especificada, eliminar o
15 reducir uno o más síntomas de la condición, retardar o eliminar la progresión de la condición, y prevenir o retardar la reocurrencia de la condición en un paciente o sujeto previamente afligido o diagnosticado. La profilaxis (o prevención o retraso de ataque de enfermedad) es normalmente lograda al administrar un medicamento
20 en la misma manera o similar a como un paciente lo haría con la enfermedad o condición desarrollada.

La presente invención proporciona un método de tratamiento en un mamífero, especialmente un humano, que sufre de diabetes o una condición relacionada tal como obesidad, síndrome X, resistencia a
25 insulina, nefropatía diabética, neuropatía diabética, retinopatía

diabética, hiperglicemia, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular, apoplejía, aterosclerosis, desórdenes de lipoproteína, hipertensión, isquemia de tejido, isquemia miocárdica y depresión. Tal tratamiento comprende el

5 paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo a dicho mamífero, en particular un humano. El tratamiento también puede comprender el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica

10 conteniendo un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo a dicho mamífero, en particular un humano.

Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" significa esa cantidad de un medicamento o agente farmacéutico que

15 provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que se está buscando, por ejemplo, por un investigador o médico clínico.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa cualquier cantidad la cual, como se compara con un sujeto

20 correspondiente que no ha recibido tal cantidad, resulta en tratamiento mejorado, curación, prevención o mejoramiento de una enfermedad, desorden o efecto lateral, o una disminución en la velocidad de avance de esa enfermedad o desorden. El término también incluye dentro de su alcance, cantidades efectivas para

25 intensificar la función fisiológica normal. Para uso en terapia,

cantidades terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I, así como sales, solvatos y derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, pueden ser administradas como el químico crudo. Adicionalmente, el ingrediente activo puede estar presentado como
5 una composición farmacéutica.

Aunque es posible que, para uso en terapia, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula I (sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo) pueda administrarse como el químico crudo, normalmente es presentado
10 como el ingrediente activo de una composición o formulación farmacéutica.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa de un compuesto (sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional) de la invención, dependerá de una variedad de factores incluyendo, pero no limitando
15 a, la edad y peso del sujeto (paciente) siendo tratado, el desorden preciso que requiere tratamiento y su severidad, la naturaleza de la formulación/composición farmacéutica, y la ruta de administración, y por último estará a la discreción del médico o veterinario encargado. Normalmente, un compuesto de Fórmula I (sal, solvato o derivado
20 fisiológicamente funcional del mismo) estará dado para el tratamiento en el rango de aproximadamente 0.1 hasta 100 mg/kg de peso corporal de receptor (paciente, mamífero) por día y más usualmente en el rango de 0.1 hasta 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosificaciones diarias aceptables pueden ser desde
25 aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1000 mg/día, y de

105

preferencia desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 mg/día. Esta cantidad puede estar dada en una sola dosis por día o en un número (tales como dos, tres, cuatro, cinco o más) de sub-dosis por día, de manera que la dosis diaria total sea la misma. Una
5 cantidad efectiva de una sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional del mismo, puede ser determinada como una proporción de la cantidad efectiva del compuesto de Fórmula I per se. Las dosificaciones similares deberían ser apropiadas para tratamiento (incluyendo profilaxis) de las demás enfermedades/condiciones
10 referidas en la presente para tratamiento. En general, la determinación de dosificación apropiada puede ser alcanzarse fácilmente por alguien experto en medicina o la técnica de farmacia.

Adicionalmente, la presente invención comprende un compuesto de Fórmula I, sal, solvato o derivado funcional fisiológico
15 del mismo, o una composición farmacéutica del mismo, con al menos otro medicamento anti-diabético. Tales medicamentos anti-diabéticos pueden incluir, por ejemplo, insulina inyectada y medicamentos tales como sales de sulfonilureas, tiazolidindionas, glipzida, glimepirida, tobutamida, acetohexamida, tolazimida,
20 biguanidas, rosiglitazona, metformina (glucófago), sitagliptina (Januvia) o combinaciones de las mismas y similares, las cuales son ingeridas oralmente. Cuando un compuesto de la invención es empleado en combinación con otro medicamento anti-diabético, se apreciará por aquéllos expertos en la técnica que la dosis de cada
25 compuesto o medicamento de la combinación puede diferir de aquél

cuando el medicamento o compuesto es usado solo. Las dosis apropiadas serán fácilmente apreciadas y determinadas por aquéllos expertos en la técnica. La dosis apropiada del compuesto de Fórmula I (sal, solvato, derivado fisiológicamente funcional del mismo) y el o los otros agentes terapéuticamente activos y los tiempos de administración relativos serán seleccionados con el fin de alcanzar el efecto terapéutico combinado deseado, y son con la experiencia y discreción del doctor o médico clínico encargado.

10 Fase experimental

Los siguientes ejemplos se pretenden para ilustración solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención en manera alguna, siendo definida la invención por las reivindicaciones. A menos que se note de otra manera, los reactivos están comercialmente disponibles o son preparados de acuerdo con procedimientos en la literatura.

Ejemplo 1: Preparación del compuesto de Fórmula IA:

N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino]carbonil]amino]-4-
20 [[2-(metiloxi)etil]oxi]fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina

Paso 1. 4-fluoro-2-nitrobenzoato de 2-(metiloxi)etilo

Acido 4-fluoro-2-nitrobenzoico (15 g, 81 mmol) se disolvió en DMF (80 ml) y 2-bromoetil metil éter (12.39 g, 89.1 mmol) se
25 adicionó seguido por carbonato de potasio (16.8 g, 121.5 mmol). La

109

solución fue calentada a 85°C durante 5 h, se enfrió y se vació sobre agua y acetato de etilo. La capa orgánica fue separada y lavada con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró para dar 21.7 g de un aceite amarillo.

- 5 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.07 (dd, J=8.3, 2.4 Hz, 1 H); 7.96 (dd, J=8.4, 2.4 Hz, 1 H), 7.72 (dt, J=8.4, 2.4 Hz, 1 H), 4.35 (m, 2H), 3.57 (m, 2H), 3.25 (s, 3H).

Paso 2. 4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]-2-nitrobenzoato de 2-(metiloxi)etilo

- 10 4-fluoro-2-nitrobenzoato de 2-(metiloxi)etilo (5 g, 20.56 mmol) se disolvió en DMF (40 ml) y 2-metoxietanol (4.7 g, 61.68 mmol) y carbonato de potasio (5.7 g, 41.12 mmol) fueron adicionados. La solución se calentó a 85°C durante 15 h y se enfrió. La mezcla se vació sobre agua y acetato de etilo y la capa orgánica fue lavada con
15 agua y salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró para dar 4.83 g (78%) de producto deseado como un aceite dorado.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm 7.8 (d, J=8.8 Hz, 1 H); 7.6 (d, J=2.4 Hz, 1 H), 7.3 (dd, J=8.7, 2.6 Hz, 1 H), 4.3 (m, 2 H), 4.2 (m, 2 H); 3.7 (m, 2 H); 3.6 (m, 2 H); 3.3 (s, 3 H); 3.2 (s, 3 H).

20

Paso 3. Ácido 4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]-2-nitrobenzoico

- 4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]-2-nitrobenzoato de 2-(metiloxi)etilo (4.83 g, 16.13 mmol) se disolvió en 1:1 TH/MeOH (80 ml) y 2 M LiOH (80 ml) fue adicionado. Después de 4 h, la reacción se concentró a
25 ~ 80 ml y 5 M HCl (34 ml) se adicionó. La solución fue extraída con

100

acetato de etilo y los extractos se secaron (MgSO_4) y concentraron para dar 3.70 g (95%) de producto como un sólido amarillo pálido.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.3 (s, 3 H); 3.6 (M, 2 H); 4.2 (m, 2H); 7.3 (dd, $J=8.7, 2.6$ Hz, 1 H), 7.5 (d, $J=2.4$ Hz, 1 H); 7.8 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H).

Paso 4. O -(1,1-dimetiletil)- N -[(4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}-2-nitrofenil)carbonil]- L -treoninato de metilo

Acido 4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}-2-nitrobenzoico (3.7 g, 15.4 mmol) e hidrocloreuro de metil O -(1,1-dimetiletil)- L -treoninato (3.8 g, 16.8 mmol) se disolvieron en acetato de etilo (50 ml) y trietilamina (4.66 g, 46.0 mmol) se adicionó. La reacción se calentó a 70°C y anhídrido cíclico de ácido 1-propanofosfónico (19.5 g de una solución al 50% en acetato de etilo, 30.6 mmol) se adicionó en forma de gotas. Después de 10 h, la solución se enfrió a RT, se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO_4) y se concentró para dar 6.84 g (108%) de producto como un aceite viscoso.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.1 (m, 9 H), 1.1 (d, $J=6.1$ Hz, 3 H), 3.3 (s, 3 H), 3.6 (s, 3 H), 3.7 (m, 2 H), 4.2(m, 3 H), 4.5 (dd, $J=8.8, 3.2$ Hz, 1 H), 7.3 (dd, $J=8.5, 2.7$ Hz, 1 H), 7.5 (m, 2 H), 8.7 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H).

Paso 5. N -[(2-amino-4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]- O -(1,1-dimetiletil)- L -treoninato de metilo

O -(1,1-dimetiletil)- N -[(4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}-2-

nitrofenil)carbonil]-L-treoninato de metilo (6.32 g, 15.3 mmol) se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y 10% Pd/C (600 mg, 15.3 mmol) se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y 10% Pd/C (600 mg) se adicionó. La mezcla se colocó en un hidrogenador Parr bajo 4.218 kg/cm² de H₂ (60 psi de H₂) dos veces sobre un periodo de 48 h. La reacción se removió del aparato, se filtró a través de celite y se concentró. El residuo fue purificado mediante cromatografía de SiO₂ (80 g de SiO₂, 10-50% de acetato de etilo/hexanos) para dar 4.83 g (82%) de producto como un aceite dorado viscoso.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm 1.1 (s, 9 H), 1.1 (d, J=6.1 Hz, 3 H), 3.3 (s, 3 H), 3.6 (m, 5 H), 4.0 (m, 2 H), 4.1 (dd, J=6.2, 3.3 Hz, 1 H), 4.4 (dd, J=8.3, 3.2 Hz, 1 H), 6.1 (dd, J=8.3, 2.4 Hz, 1 H), 6.2 (d, J=2.4 Hz, 1 H), 6.5 (s, 2 H), 7.3 (d, J=8.5, 1 H); 7.4 (d, J=8.8 Hz, 1 H).

15

Paso 6. (4-amino-3,5-dimetilfenil)(ciclopropil)metanol

Un reactor de laboratorio enchaquetado de 10 l, equipado con un agitador mecánico, se cargó con diclorometano (6 l) y DMF (201 g, 2.75 mol). La chaqueta se enfrió a 15°C y cloruro de oxalilo (348.8 g, 2.75 mol) se adicionó sobre ca. 20 min. Después de agitar unos 5 min adicionales, 4-bromo-2,6-dimetilanilina (500 g, 2.50 mol) en diclorometano (1 l) se adicionó. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y entonces la capa de diclorometano fue lavada con NaOH N (3 l), agua (2 l) y 50% de salmuera (1 l). La capa de diclorometano fue destilada entonces a un volumen de 2 l, THF (4 l)

25

110

se adicionó nuevamente y la mezcla se destiló a 2 l, y se adicionaron unos 5 l finales de THF. La solución resultante se enfrió a ca. -70°C, y n-butil litio (2.5 M en hexanos, 1.25 l, 3.12 mol) se adicionó sobre ca. 40 min, en lo cual la temperatura interna fue mantenida a <-50°C.

5 Después de que la adición fue completa, la reacción se enfrió a -60°C y ciclopropanocarbaldehído (221.45 g, 3.12 mol) se adicionó a tal velocidad para mantener la temperatura interna <-48°C. Entonces se permitió que la mezcla se calentara a RT y agua (2 l) se adicionó la mezcla se destiló a un volumen de ca. 2 l, entonces se adicionó

10 monohidrato de hidróxido de litio (315 g, 7.50 mol) en agua (2 l) y etanolamina (460 g, 7.5 mol). La mezcla se llevó a reflujo e isopropanol (1 l) se adicionó. Después de someter a reflujo durante ca. 18 h, la reacción se enfrió a RT y el pH fue ajustado a ca. 10 con HCl concentrado. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 2 l,

15 1 x 1 l) y los orgánicos combinados se lavaron con agua (1 l). la solución resultante fue concentrada a ca. 1l, se calentó a reflujo y entonces se enfrió a 0°C. Los sólidos resultantes fueron recolectados mediante filtración, se lavaron con acetato de etilo y hexanos y se secaron bajo vacío a ca. 45°C para dar 254.4 g (53%)

20 del producto. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: 6.80 (s, 2H), 4.75 (brs, 1H), 4.38 (brs, 2H), 3.74 (d, J=7.2 Hz, 1H), 2.07 (s, 6H), 1.04-0.93 (m, 1H); 0.45 – 0.15 (m, 4H).

Paso 7. Hidrocloruro de 4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilanilina

25 A (4-amino-3,5-dimetilfenil)(ciclopropil)metanol (10.0 g, 52.3

mmol) en diclorometano (100 ml) enfriado a ca. 10°C se adicionó ácido trifluoroacético (7.15 g, 62.7 mmol) lentamente. Después de agitar ca. 4 min de trietilsilano (7.30 g, 62.7 mmol) se adicionó en forma de gotas sobre ca. 20 min. La reacción se agitó a ca. 10°C
5 durante 40 min, y entonces se concentraron bajo presión reducida a ca. 20ml y acetato de etilo (100 ml) se adicionó. Esto se concentró ca. 50 ml, acetato de etilo se adicionó (25 ml) y con agitación se adicionó HCl concentrado (5 ml). Después de agitar ca. 15 min, los sólidos fueron recolectados mediante filtración, se lavó con acetato
10 de etilo/hexanos (1:1) y se secaron bajo presión reducida para dar 10.1 g (91%) del producto. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: 9.15-9.75 (brs, 2H), 6.95 (s, 2H), 2.36 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.28 (s, 6H); 0.88 (m, 1H), 0.40 (m, 2H), 0.12 (m, 2H).

Esta reacción se repitió en 8 g de material de inicio y el
15 producto resultante (8.1 g) se combinó con el material anterior.

Paso 8. 5-(ciclopropilmetil)-2-isocianato-1,3-dimetilbenceno

Una solución de hidrocloreuro de 4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilanilina (11.1 g, 52.4 mmol) y diisopropiletilamina (10.0 ml, 57.7 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (50 ml) se adicionó en forma de gotas
20 a una solución de agitación de trifosgeno (7.78 g, 26.2 mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml). Después de que la adición se completó, la solución se agitó durante 45 min y entonces el solvente fue concentrado en una campana de humo (Precaución: un fosgeno sin reaccionar puede
25 estar presente). El residuo resultante fue disuelto en heptanos,

112

lavado con agua, secados (MgSO₄) y se concentró para dar 9.21 g (87%) de producto como un aceite viscoso nebuloso. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: 0.1 (m, 2H), 0.4 (m, 2 H); 0.9 (m, 1 H); 2.2 (s, 6 H), 2.4 (d, J=6.8 Hz, 2 H), 7.0 (s, 2 H).

5

Paso 9. *N*-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-[[2-(metiloxi)etiloxi]fenil]carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de metilo

10 *N*-[(2-amino-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de metilo (4.74 g, 12.39 mmol) se disolvió en piridina (50 ml) y 5-(ciclopropilmetil)-2-isocianato-1,3-dimetilbenceno (3.74 g, 18.59 mmol) se adicionó. La reacción se agitó durante 7 h y entonces se vació sobre HCl 1 M en capas con acetato de etilo. La
15 capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se concentró a un aceite amarillo. El aceite fue purificado mediante cromatografía de SiO₂ (120 g SiO₂, 0 – 50% EA/hexanos) para dar 5.15 g (71%) de producto como una espuma incolora. ES MS m/z 584 (M+H).

20

Paso 10. *N*-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]fenil]carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina

N-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-[[2-

25

113

(metiloxietil)oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de metilo (5.1 g, 8.73 mmol) se disolvió en 1:1 THF/MeOH (40 ml) y 2 M LiOH (21.8 ml, 43.68 mmol) se adicionó. Después de 3 h, 1 M HCl (45 ml) y agua (100 ml) se adicionaron y la mezcla se extrajo con EA. Los extractos se secaron (MgSO₄), se combinaron con extractos de una segunda reacción iniciando desde 0.8 g de material de inicio y se concentró para dar 5.97 g (102% global) de producto como una espuma incolora.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm; 0.2 (m, 2H); 0.4 (m, 2H); 0.9 (m, 1 H); 1.1 (s, 12 H), 2.1 (m, 6 H), 2.4 (d, J=7.0 Hz, 2 H), 3.3 (s, 3 H), 3.6 (m, 2 H), 4.1 (m, 2 H), 4.2 (br s, 1 H), 4.4 (br s, 1 H), 6.6 (dd, J=8.7, 2.7 Hz, 1 H), 6.9 (s, 2 H), 7.7 (br s, 1 H), 7.8 (br s, 1 H), 8.0 (d, J=2.5 Hz, 1 H), 8.7 (br s, 1 H), 10.5 (br s, 1 H), 12.8 (s, 1 H). ES MS m/z 570 (M+H).

Ejemplo 2: Síntesis a escala mayor de compuesto de fórmula IA

N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino]carbonil]amino]-4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina

Paso 1. Ácido 4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}-2-nitrobenzoico

A ácido 4-fluoro-2-nitrobenzoico (200 g, 1.08 mol) en un reactor de laboratorio enchaquetado equipado con un agitador mecánico, se adicionó NMP (0.90 l) y carbonato de potasio (520 g, 3.80 mol). La chaqueta de reacción se calentó a 50°C y 2-bromoetil metil éter (120 ml, 1.28 mol) se adicionó sobre 10 min. La

temperatura de chaqueta de reacción fue aumentada a ca. 129°C y la
reacción se agitó durante 1 h. NMP (80 ml), 2-(metiloxi)etanol (520
ml) y carbonato de potasio (15 g) fueron adicionados. La
temperatura de chaqueta fue aumentada a ca. 135°C y la reacción se
5 agitó durante ca. 1 h, y entonces la temperatura de chaqueta fue
incrementada a 150°C y la reacción se agitó durante ca. 5 h. La
mezcla fue enfriada a RT y se agitó a ca. 16 h. A esto se adicionó
una mezcla de hidróxido de sodio acuoso al 50% (235 ml) y agua
(0.77 l). Después de agitar 1 h, la mezcla se transfirió a una cubeta
10 con agua (0.50 l), se acidificó con HCl 6 N (ca. 2 l) y se agitó para
ca. 1.5 h. Los sólidos resultantes fueron recolectados mediante
filtración y se lavaron con agua. El secado bajo presión reducida a
ca. 70°C dio 160 g del producto. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ
ppm: 13.53 (br s, 1H), 7.83 (d, J=8.5 Hz, 1H); 7.48 (d, J=2.5 Hz, 1H);
15 7.26 (dd, J=8.8, 6.2 Hz, 1 H), 4.23 (m, 2H), 3.65 (m, 2H), 3.28 (s,
3H).

Las reacciones de escala más pequeña adicionales del
procedimiento anterior también fueron realizadas para dar material
adicional. Las propiedades espectrales fueron las mismas que
20 antes.

Paso 2. O-(1,1-dimetiletil)-N-[(4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]-2-
nitrofenil)carbonil]-L-treoninato de metilo

A ácido 4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]-2-nitrobenzoico (205, g, 0.97
25 mol) disuelto en diclorometano (2.5 l) y DMF (2.5 ml), en un reactor

115

de laboratorio enchaquetado equipado con un agitador mecánico, con la temperatura de chaqueta a ca. 27°C, se adicionó cloruro de oxalilo (104 ml, 1.23 mol) en forma de gotas sobre ca. 20 min. Con la temperatura de chaqueta a 30°C, la reacción se agitó durante ca. 2 h y entonces se concentró bajo presión reducida. El residuo fue disuelto en acetonitrilo (0.50 l), se concentró bajo presión reducida, y se re-disolvió en acetonitrilo (0.30 l). Esto se adicionó entonces en forma de gotas a una mezcla fría (<10°C) de hidrocloreuro de metil O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato (195 g, 0.86 mol), y DIEA (390 ml) se disolvió en acetonitrilo (1.5 l), en un reactor de laboratorio enchaquetado con un agitador mecánico. Cuando la adición se completó, la reacción fue calentada a RT y se diluyó con metil t-butil éter (3 l) y se lavó con 1:1 salmuera:agua (1.5 l), 1:1 bicarbonato de sodio:agua (1.5 l) y nuevamente con 1:1 salmuera:agua (1.5 l). La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a ca. 1.5 l. A esto se adicionó heptano (1.5 l) y esto fue concentrado a sequedad. El sólido resultante fue triturado con una mezcla de metil t-butil éter (210 ml) y heptano (220 ml) y los sólidos fueron recolectados mediante filtración. Este material fue combinado con una preparación a escala más pequeña (28 g) y se secó bajo presión reducida para dar 338 g del producto. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 8.68 (d, J=3.8 Hz, 1 H), 7.53 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.49 (d, J=8.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, J=8.5, 2.6 Hz, 1H), 4.51 (dd, J=8.7, 3.2 Hz, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.65 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 1.13 (d, J=6.4 Hz, 3H), 1.08 (s, 3H).

116

Paso 3. *N*-[(2-amino-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi]fenil)carbonil]-*O*-(1,1-dimetiletil)-*L*-treoninato de metilo

O-(1,1-dimetiletil)-*N*-[(4-[[2-(metiloxi)etil]oxi)-2-nitrofenil)carbonil]-*L*-treoninato de metilo (100.3 g, 0.243 mol) se
5 disolvió en metanol (2 l) y el matraz de reacción fue vaciado y
descargado 3 veces con nitrógeno. A esto se adicionó paladio en
carbón (10%, 10 g) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de
hidrógeno para ca. 4 h. La mezcla se filtró y se concentró bajo
presión reducida. El residuo se disolvió en tolueno (0.25 l) y se
10 concentró bajo presión reducida para dar 91.4 g del producto como
un aceite ámbar (98%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.38 (d,
J=1.7 Hz, 1 H), 6.70 (d, J=9 Hz, 1H); 6.31 (dd, J=8.7, 2 Hz, 1H), 6.21
(d, J=2 Hz, 1H), 5.80 (br, 2H), 4.62 (dd, J=9, 1.7 Hz, 1H), 4.27 (m,
1H), 4.09 (m, 2H), 3.72 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 1.22 (d,
15 J=6.1 Hz, 3H), 1.12 (s, 9H).

Este procedimiento se repitió dos veces iniciando con 20.5 g y
160 g del compuesto nitro para dar unos 162.8 g adicionales de
producto.

20 Paso 4. *N'*-(4-bromo-2,6-dimetilfenil)-*N,N*-dimetilimidoformamida

Método 1

A DMF (21.3 ml, 0.275 mol) en diclorometano (0.50 l), en
matraz de reacción equipado con un agitador mecánico, bajo una
atmósfera de nitrógeno, se adicionó cloruro de oxalilo (23.3 ml, 0.275
25 mol) sobre 1 h. Después de agitar 10 min, 4-bromo-2,6-dimetilanilina

(50.0 g, 0.250 mol) en diclorometano (0.20 l) se adicionó a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción entre ca. 22 y 27°C (ca. 1.5 h). La reacción se agitó durante ca. 1 h y entonces se extinguió mediante la adición de hidróxido de sodio 2N (0.25 l) a tal
5 velocidad para mantener la temperatura de reacción entre 10 y 15°C. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (0.20 l), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en hexanos (0.4 l) y se concentró a sequedad. El producto se bombeó bajo presión reducida para dar 62.2 g (97.6%)
10 del producto como un aceite café obscuro. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: 7.28 (s, 1H), 7.09 (s, 2H), 2.90 (s, 6H); 2.00 (s, 6H).

Método 2

15 A una pasta de reactive Vilsmeier (43.2 g, 0.34 mol) en diclorometano (0.40 l), en un matraz de reacción equipado con un agitador mecánico, bajo una atmósfera de nitrógeno, se adicionó 4-bromo-2,6-dimetilanilina (61.4 g, 0.31 mol) en diclorometano (0.20 l) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción entre ca.
20 20 y 28°C (ca. 1.5 h). La reacción se agitó durante a. 1 h y entonces se extinguió mediante la adición de hidróxido de sodio 2N (0.35 l) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción entre 10 y 15°C. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (0.3 l), se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a
25 sequedad. El residuo se disolvió en hexanos (0.4 l) y se concentró a

118

sequedad. El producto se bombeó bajo presión reducida para dar 75.7 g (97%) del producto como un aceite café oscuro. Las propiedades espectrales fueron las mismas que antes.

5 Escalamiento de método 2

A una pasta de reactivo Vilsmeier (211.8 g, 1.66 mol) en diclorometano (1.97 l), en un reactor de laboratorio enchaquetado equipado con un agitador mecánico, bajo una atmósfera de nitrógeno, se adicionó 4-bromo-2,6-dimetilanilina (301.91 g, 1.509 mol) en diclorometano (0.98 l) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción <25°C (ca. 1.5 h). La reacción se agitó por ca. 1 h y entonces se extinguió mediante la adición de hidróxido de sodio 2N (1.7 l) a tal velocidad para mantener la temperatura de reacción entre 10 y 15°C. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua (1.43 l), se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en hexanos (1 l) y esto se concentró a sequedad. Esto se repitió y el producto se bombeó bajo presión reducida para dar 376.82 g (97.8%) del producto como un aceite café oscuro. Las propiedades espectrales fueron iguales como antes.

Paso 5. *N'*-{4-[ciclopropil(hidroximetil)-2,6-dimetilfenil]-*N,N*-dimetilimidoformamida

N'-(4-bromo-2,6-dimetilfenil)-*N,N*-dimetilimidoformamida (489.7 g, 1.92 mol) se disolvió en THF (5 l) en un reactor de laboratorio

enchafetado equipado con un agitador mecánico bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a -70°C y *n*-butil litio (2.5 N en hexanos, 1.152 l, 2.88 mol) se adicionó a tal velocidad para mantener la temperatura interno entre ca. -65 y -70°C . Una vez
5 la adición se completó, ciclopropanocarbaldehído (201.86 g, 2.88 mol) se adicionó a tal velocidad para mantener la temperatura interna entre ca. -50 y -70°C . Se permitió que la reacción se calentara a 0°C y se extinguió mediante adición en forma de gotas de agua (1.96 l) a tal velocidad que la temperatura interna fue
10 mantenida entre 0 y 5°C . El solvente orgánico se removió bajo presión reducida y la capa de agua restante y producto suspendido se transfirieron a un reactor de laboratorio enchafetado para ser usado directamente en el siguiente paso. Se removió una alícuota para análisis espectral de masa: ES MS m/z 247 ($M+H$).

15

Paso 6. (4-amio-3,5-dimetilfenil)(ciclopropil)metanol

Al material del previo paso (*N'*-{4-[cicloproil(hidroxi)metil]-2,6-dimetilfenil}-*N,N*-dimetilimidoformamida) se adicionó una suspensión de hidróxido de litio (305 g, 12.73 mol) en agua (1.96 l), seguido por
20 la adición de etanolamina (221.48 g, 3.63 mol). La mezcla se calentó a reflujo durante ca. 16 h. La reacción se destiló para remover 980 ml de líquido e isopropanol (1.47 l) se adicionó y la mezcla se regresó a reflujo durante ca. 5 h. Después de enfriar a RT, se adicionó acetato de etilo (2.5 l) y las capas se separaron.
25 Ambas capas fueron filtradas para remover sólidos y la capa acuosa

se extrajo nuevamente con acetato de etilo (2 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua (2 x 0.5 l), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a volumen de ca. 1.4 l. Los sólidos resultantes fueron recolectados mediante filtración y se lavaron con acetato de etilo y hexanos. Después de secar bajo presión reducida, 142.47 g del producto se obtuvieron como un sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ ppm: 6.79 (s, 2H), 4.72 (d, J=4.1 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.72 (dd, J=7.2, 4.2 Hz, 1H), 2.06 (s, 6H), 0.91 (m, 1H), 0.12-0.48 (m, 4H).

Los licores madre produjeron unos 37.91 g adicionales de producto con propiedades espectrales idénticas. El rendimiento total fue 49% para dos pasos.

Paso 7. Hidrocloruro de [4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amina

A (4-amino-3,5-dimetilfenil)(ciclopropil)metanol (169.13 g, 0.684 mol) en diclorometano (1.68 l) enfriado a 15°C se adicionó trietilsilano (123.4 g, 1.06 mol), seguido por ácido trifluoroacético (83.7 g, 0.734 mol) a una velocidad para mantener la temperatura de reacción interna entre 15 y 16°C. La reacción se agitó durante 7 h y entonces el diclorometano fue destilado y se adicionó acetato de etilo (1.68 l). Esto fue destilado a un volumen de ca. 1.1 l y unos 280 ml adicionales de acetato de etilo se agregaron. Con agitación a 20°C, se adicionó HCl concentrado (73 ml) y la mezcla se agitó durante ca. 15 min. Los sólidos resultantes fueron recolectados mediante filtración y se lavaron con 1:1 acetato de etilo:hexanos

para dar 177.22 g del producto como un sólido color tostado (95%).
¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 9.3-9.91 (brs, 2H), 7.01 (s, 2H),
 2.41 (d, J=6.9 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H); 0.92 (m, 1H), 0.47 (m, 2H), 0.15
 (m, 2H).

5

Paso 8. 5-(ciclopropilmetil)-2-isocianato-1,3-dimetilbenceno

A una solución de trifosgeno (81.3 g, 0.274 mol) en
 diclorometano (0.855 l) se adicionó una mezcla de hidrocloreuro de [4-
 (ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amina (115 g, 0.543 mol) y DIEA
 10 (176.7 g, 1.37 mol) en diclorometano (0.3 l) manteniendo la
 temperatura menor que 25°C. La reacción se agitó ca. 16 h y
 heptano (1.0 l) se adicionó. La mezcla se lavó con agua (2 veces
 0.30 l). Las fases acuosas se extrajeron nuevamente con heptano (2
 veces 0.10 l) y los orgánicos combinados fueron secados sobre
 15 sulfato de magnesio. La concentración bajo presión reducida dio
 98.95 g del producto como un aceite (91% de rendimiento). ¹H NMR
 (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 6.92 (s, 2H), 2.41 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.30
 (s, 6H), 0.93 (m, 1H), 0.50 (m, 2H), 0.16 (M, 2H).

20 Paso 9. *N*-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-
 dimetilfenil]amino]carbonil]amino]-4-{[2-
 (metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de
 metilo

N-[(2-amino-4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-
 25 dimetiletil)-L-treoninato de metilo (144 g, 0.377 mol) y 5-

122

(ciclopropilmetil)-2-isocianato-1,3-dimetilbenceno (98.9 g, 0.491 mol) se combinaron en piridina (1.0 l) y la mezcla se agitó a RT de ca. 16 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se disolvió en metil t-butil éter (1 l). Esto se lavó con 0.1 N HCl (4
5 veces 0.5 l). El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo fue sometido a cromatografía en gel de sílice (1.5 kg), levigando con acetato de etilo/hexano (gradiente), para dar 181 g del producto como una espuma. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 10.42 (brs, 1H), 8.70 (brs, 1H), 8.01 (brs, 1H), 7.97 (d, J=2.2 Hz,
10 1H), 7.66 (d, J=8.1 Hz, 1H), 6.92 (s, 2H), 6.57 (dd, J=8.8, 2.5 Hz, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.05 (m, 2H), 3.64 (s, 3H); 3.62 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 2.39 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.14 (m, 3H), 1.09 (s, 9H); 0.92 (m, 1H), 0.43 (m, 2H), 0.15 (m, 2H).

15 Paso 10. N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino}carbonil)amino]-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina

A N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino}carbonil)amino]-4-[[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de
20 metilo (179 g, 0.306 mmol) en THF (1 l) se adicionó monohidrato de hidróxido de litio (38.5 g, 0.92 mol) en agua (0.33 l) en forma de gotas sobre ca. 30 min. La mezcla se agitó a RT durante 2 días, y entonces se enfriaron en un baño de hielo y el pH se ajustó a ca. 1
25 mediante la adicionó de 6 N HCl. A esto se adicionó acetato de etilo

(1.5 l) y la mezcla se agitó a 10°C durante ca. 30 min. Las capas fueron separadas y la fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (0.2 l). Los orgánicos combinados fueron secados sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar 180 g del producto, el cual contenía algún acetato de etilo y THF. Este material (se combinó con un lote de 9 g más pequeño) se cristalizó a partir de acetonitrilo (1.7 l) y agua (1.36 l) para dar, después de secar bajo presión reducida a 50°C, 125.5 g del producto fue un sólido blanco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 12.78 (brs, 1H), 10.52 (brs, 1H), 8.68 (brs, 1H); 7.98 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.75 (brs, 1H), 7.63 (d, J=7.9 Hz, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.58 (dd, J=(8.8, 2.4 Hz, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.16 (m, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.62 (m, 2H), 3.27 (s, 3H), 2.39 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H); 1.11 (m, 3H), 1.11 (s, 9H), 0.92 (m, 1H); 0.43 (m, 2H), 0.15 (m, 2H). Anal. Calculado para C₃₁H₄₃N₃O₇: C, 65.36; H, 7.61; N, 7.38. Encontrado: C, 65.59; H, 7.59; N, 7.41.

Ejemplo 3: Preparación de la sal de potasio del compuesto de Fórmula IA

N-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treoninato de potasio

A N-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-{[2-(metiloxi)etil]oxi}fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina (1.0 g,

1.76 mmol) en acetonitrilo (100 ml) se adiciona t-butoxido de potasio (1.0 M en THF, 1.76 ml). La mezcla se agitó durante ca. 15 min y el solvente es removido bajo presión reducida para dar el producto.

5 **Protocolos biológicos**

La utilidad de los compuestos de Fórmula I, una sal, solvato o derivado fisiológicamente funcional de los mismos, en el tratamiento o prevención de enfermedades (tal como se describe en la presente) en animales, en particular mamíferos (por ejemplo, humanos) pueden
10 demostrarse mediante la actividad en ensayos convencionales conocidos para alguien de habilidad ordinaria en la técnica relevante, incluyendo los ensayos in vitro e in vivo descritos más adelante.

La enzima glicógeno fosforilasa (GP) purificada, en donde la glicógeno fosforilasa está en el estado activado "a", referido como
15 glicógeno fosforilasa de hígado humano a (HLGPa), puede obtenerse de acuerdo con los siguientes procedimientos.

Clonación y expresión apropiada de glicógeno fosforilasa de hígado humano:

20 cDNA de glicógeno fosforilasa de hígado humano fue amplificado mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR) a partir de una genoteca de cDNA de hígado humano comercialmente disponible (BD Biosciences). El cDNA fue amplificado como 2 fragmentos de traslape usando los iniciadores
25 5'GGCGAAGCCCCTGACAGACCAGGAGAAG3' con

5'CGATGTCTGAGTGGATTTTAGCCACGCC3' y
5'GGATATAGAAGAGTTAGAAGAAATTG3' con
5'GGAAGCTTATCAATTTCCATTGACTTTGTTAGATTTCATTGG3'. Las
condiciones de PCR fueron 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min,
5 durante 40 ciclos usando la enzima Pfu Turbo (Stratagene), 0.5%
DMSO, 250 uM cada trifosfato de nucleótido y 0.4 uM cada iniciador
más el amortiguador recomendado por el fabricante de polimerasa.
Cada fragmento de PCR fue clonado molecularmente y la secuencia
de DNA de cada inserción fue determinada. Los 2 fragmentos de
10 DNA del cDNA de glicógeno fosforilasa fueron unidos entonces en un
plásmido de expresión bacteriana, pTXK1007LTev (GlaxoSmithKline),
creando un cDNA de longitud completa fusionado en el extremo 5' a
los codones para metionina-glicina-alanina-histidina-histidina-
histidina-histidina-histidina-histidina-glicina-glicina-glutamato-
15 asparagina-leucina-tirosina-fenilalanina-glutamina-glicina-glicina-. El
producto de proteína tendría una etiqueta de 6Xhistidina seguido por
un sitio de corte de Tev proteasa. La secuencia de DNA de ambos
filamentos del cDNA en pTXK1007L Tev fue determinada.

20 Purificación de glicógeno fosforilasa de hígado humano:

La pasta celular congelada (100 g) fue descongelada y
suspendida en 1200 ml de 50 mM Tris, 100mM NaCl, 15 mM
imidazol, pH 8.0. Las células fueron rotas suavemente con un
Polytron (Brinkman, PT10-35) y pasaron dos veces a través de un
25 homogeneizador AVP. Los lisados de células de E. coli fueron

clarificados a 27,500 x g durante 45 minutos y se filtraron a través de un filtro de 0.8 micra. La solución fue aplicada a una columna de 21ml Ni-NTA Superflow (Qiagen) (ID 26mm X H 4.0 cm) pre-equilibrada con 50 mM Tris, 100 mM NaCl y 15 mM imidazol, pH 8.0.

5 La columna fue lavada con amortiguador de equilibrio hasta que A280 regresó a la línea de base. Las proteínas débilmente unidas fueron levigadas a partir de la columna con 10 volúmenes de columna de lecho de 50mM imidazol en el mismo amortiguador. La glicógeno fosforilasa fue levigado con pasos de 100 mM y 250 mM

10 Imidazol. Ambas fracciones de 100 mM y 250 mM fueron depositadas y entonces se diluyeron 5 veces con amortiguador 50mM Tris, pH 8.0. Esta solución fue cargada en una columna de flujo rápido 21 ml de Q (Amersham Pharmacia Biotech AB, ID 2.6 cm x H 4.0 cm) pre-equilibrada con 50 mM Tris, pH 8.0. Se levigó glicógeno

15 fosforilasa con un gradiente continuo desde 0-30% de 1M NaCl en 50 mM Tris, pH 8.0 (amortiguador B). Las fracciones de glicógeno fosforilasa purificada entre 15% y 20% amortiguador B fueron depositados, divididos en alícuotas en tubos de microcentrífuga, y se almacenaron a -80°C. La fracción purificada formó una banda simple

20 de ~100kd en un gel de SDS-PAGE.

Activación de glicógeno fosforilasa de hígado humano:

La activación de glicógeno fosforilasa de hígado humano (es decir, la conversión de forma de HLGPb inactiva a la forma HLGPa

25 activada) se alcanzó al fosforilar HLGPb con fosforilasa cinasa

inmovilizada.

10 mg de cinasa fosforilasa (Sigma, P-2014) se disolvió en 2.5 ml de 100mM HEPES, 80mM CaCl₂ (pH 7.4) y se mezcló suavemente con 1 ml de perlas Affi-Gel (Active Ester Agarose, BioRad # 153-6099) equilibradas previamente en el mismo amortiguador. La mezcla se mecío 4 horas a 4°C. Las perlas se lavaron una vez con el mismo amortiguador y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de 50 mM HEPES, 1 M metil éster de glicina, pH 8.0. Las perlas fueron lavadas entonces con 50 mM HEPES, 1 mM β-mercaptoetanol, pH 7.4 y se almacenaron a 4°C.

Glicógeno fosforilasa purificada congelada (HLGPb) se descongeló en a 4°C entonces se dializó durante la noche en 50 mM HEPES; 100 mM NaCl, pH 7.4. 15 mg del HLGPb dializado, 3 mM ATP y 5 mM MgCl₂ se incubó con 500 ul de las perlas de cinasa fosforilasa inmovilizada Affi-Gel preparadas equilibradas con 50 mM HEPES; 100 mM NaCl, pH 7.4. El grado de fosforilación se monitoreó al seguir el aumento en actividad a intervalos de 10 minutos usando el sistema de ensayo señalado más adelante. Brevemente, el ensayo contenía 0.1 uM glicógeno fosforilasa de hígado humano, 50 mM HEPES, 100 mM KCl, 2.5 mM EGTA, MgCl₂, 3.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM DTT; 0.4 mg/ml glicógeno, 7.5 mM glucosa, 0.50 mM dinucleótido de β-nicotinamida adenina (β-NAD), 3 U/ml fosfoglucomutasa, y 5 U/ml glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La actividad fue monitoreada al seguir la reducción de NAD⁺ a 340 nm. La reacción se detuvo mediante remoción de las perlas a partir de la

mezcla cuando ningún aumento en actividad fue observado 830-80 minutos). La fosforilación fue confirmada adicionalmente mediante análisis de la muestra mediante espectroscopía de masa. El sobrenadante conteniendo la muestra actividad fue dializada en 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.4 durante la noche. La muestra final se mezcló con un volumen igual de glicerol, dividida en alícuotas en tubos de microcentrifuga y se almacenó a -20°C.

Ensayo de actividad enzimática de glicógeno fosforilasa de hígado humano a:

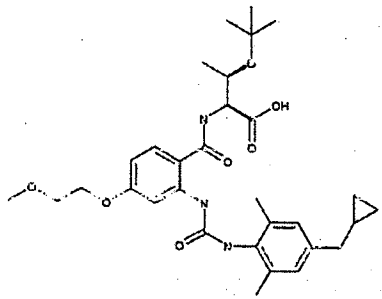
Un ensayo enzimático fue desarrollado para medir la respuesta de la forma activada de glicógeno fosforilasa (HLGPa) a compuestos de molécula pequeña (<1000 Da.). El ensayo fue configurado para monitorear la reacción glicogenolítica farmacológicamente relevante al coplar la producción de glucosa-1-fosfato a partir de glicógeno y fosfato inorgánico a fosfoglucomutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenada, NADH oxidada y peroxidada de rábano picante par producir el producto fluorescente resorufin. Las concentraciones de los componentes reactivos fueron como sigue: 15 nM glicógeno fosforilasa de hígado humana a, 1 mg/ml glicógeno, 5 mM K₂HPO₄, 40 U/ml fosfoglucomutasa (Sigma), 20 u/ml glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma), 200 nM NADH oxidasa de *Thermus thermophilus* (preparada como se describe en Park, H.J.; Kreutzer, R.; Reiser, C.O.A.; Sprinzl, M. Eur. J. Biochem. 1992, 205, 875-879), 2 U/ml de peroxidasa de rábano picante (Sigma), 3 uM FAD, 250 uM

129

NAD⁺, 50 uM rojo amplex, +/- 10 mM glucosa. El amortiguador de ensayo de base usado fue 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.6. Para ayudar en la identificación de inhibidores sensibles a glucosa de glicógeno fosforilasa, el ensayo fue realizado con y sin 10 mM glucosa. Con el fin de frotar el ensayo de componentes contaminantes que pueden contribuir a producción de resorufin específica no de HLGP_a, los reactivos fueron preparados como dos cocteles concentrados 2x. Una solución de perlas de agarosa recubiertas con catalasa fue preparada en el amortiguador de ensayo de base. El primer coctel (coctel #1) consistió de NADH oxidada de *Thermus thermophilus*, NAD⁺, glicógeno, fosfoglucomutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, K₂HPO₄, FAD y 50 U/ml perlas de agarosa recubiertas con catalizada +/- 10 mM glucosa. El rojo Amplex fue adicionado a esta solución después de incubación a 25°C durante 30 minutos y las perlas de agarosa recubiertas con catalasa fueron removidas mediante centrifugación y retención de sobrenadante. El segundo coctel (coctel #2) contenía glicógeno fosforilasa-a de hígado humano y peroxidasa de rábano picante +/- 10 mM glucosa. Los ensayos fueron realizados con preincubación de compuestos de esta invención con coctel #2 durante 15 minutos, seguido mediante la adición de coctel #1 para iniciar la reacción. Los ensayos fueron realizados en placas de microtítulo de 96 (negras 1/2 volumen Costar #3694) o 384 cavidades (Greiner negras de volumen pequeño). El cambio en fluorescencia debido la formación de producto fue medida en un lector de placa de fluorescencia

(Molecular Devices SpectraMax M2) con excitación a 560 nm y emisión a 590 nm. La actividad de compuesto de ejemplo 1 es mostrada en la Tabla 1 a continuación.

5 **Tabla 1:** Actividad del ensayo enzimático de compuesto en glicógeno fosforilasa de hígado humano a

Ej #	Estructura	Nombre químico	ESM +m/z	IC50 (uM)
1		N-[(2-[[[4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino} carbonil)amino]-4-{[2-(metiloxi)etil]*oxi}fenil) carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina	570 (M+H)	0.004

Método de reto de glucagón in vivo:

Se recibieron ratas de CD macho canuladas de vena yugular (220-260 g) (Charles Rivers, Raleigh, NC) 1-2 día después de canulación, se alojaron de manera individual en cama Alpha-dri^{MR} (Shepherd Specialty Papers, Inc., Kalamazoo, MI) con acceso libre a alimento (Lab Diet 5001, PMI Nutrition International, Brentwood, MO) y agua y se mantuvieron en un ciclo de luz/obscuridad de 12 h a 21°C y 50% de humedad relativa durante 3-4 días antes de los estudios de reto de glucagón. En el día del estudio, las ratas fueron

clasificadas por peso corporal en grupos de tratamiento (N=4-5) y se alojaron de manera individual en jaulas de caja de zapato con cama Alpha-dri limpia. Las líneas de cánula fueron abiertas por remoción de 0.2 ml de sangre y se descargaron con 0.2 ml de solución salina
5 estéril. Después de una hora de climatización, las muestras de sangre fueron recolectadas para determinar glucosa basal y las ratas fueron dosificadas oralmente con vehículo (5% DMSO: 30% Solutol HS15: 20% PEG400: 45% 25 mM N-metilglucamina) o medicamento (5 ml/kg). Dos horas después de la dosificación de medicamento,
10 una muestra de sangre de tiempo cero (0.4 ml) se recolectó para determinación de glucosa y las ratas fueron dosificadas a través de la vena yugular con Sandostatina, 0.5 mg/kg, (Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover, NJ) y glucagón, 10 ug/kg (Bedford Laboratories, Bedford, OH). Las muestras de sangre fueron
15 recolectadas después de 10 y 20 min para determinación de glucosa. La sangre entera fue colocada en un tubo de recolección de sangre Terumo Capiject (Terumo Medical Corp., Elkton, MD), se permitió que se asentara a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y entonces se centrifugó (3,000 X G) para obtener suero. Los niveles
20 de suero de glucosa fueron determinados usando un inmuno-analizador de química clínica Olympus AU640^{MR} (Olympus America Inc., Melville, NY). El % de reducción (% R) de AUC de vehículo glucosa se calculó para cada tratamiento de medicamento usando la fórmula % de reducción = 100 + 1- (AUC medicamento/AUC
25 vehículo), donde AUC se calculó a partir de valores de glucosa en

suero usando la ecuación

$AUC = (T0+T10)/2*10 + (T10+T20)/2*10 - (T0+20)$. La actividad de compuesto de ejemplo 1 es mostrada en la Tabla 2 a continuación.

5 **Tabla 2:** actividad del compuesto en el modelo de reto de glucagón in vivo

Dosis de N-[(2-[(4-(ciclopropilmetil)-2,6-dimetilfenil]amino)carbonil)amino]-4-[(2-(metiloxi)etil)oxi]fenil)carbonil]-O-(1,1-dimetiletil)-L-treonina (compuesto de ejemplo 1) (mg/kg)	% R
0.1	4
0.5	36
2	48
5	76



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXOSMITHKLINE LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 036338
	Solicitud internacional	PCT/US2009/077624
	Fecha inicio fase nacional	28/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>06384</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

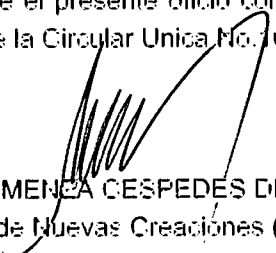


Continuación radicado No: 10 036338



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CARMENCA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 MAYO 2010
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

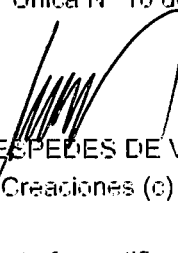
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXOSMITHKLINE LLC

REFERENCIA	Radicación No.	10 036333
	Solicitud internacional	PCT/US2008/077624
	Fecha inicio fase nacional	28/04/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>063854</u>

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

14 MAYO 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.
adpa11