

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056870- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 15:15:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: TERAPIA DE COMBINACIÓN USANDO UN AGONISTA DEL
RECEPTOR ADRENÉRGICO BETA 3 Y UN AGENTE ANTIMUSCARÍNICO

SOLICITANTE: MERCK SHARP & DOHME CORP.

DIRECCIÓN: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907
E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 4 de Abril de 2012

P2012/000035

OLARTEMOURE

OLARTE MOU

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-056870- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 15:15:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

cción.

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000035

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MERCK SHARP & DOHME CORP.

Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway,
New Jersey 07065-0907 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estado Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747

TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/050328 Fecha Septiembre 27, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/043942 Fecha Abril 14, 2011

6

Título (54) TERAPIA DE COMBINACIÓN USANDO UN AGONISTA DEL RECEPTOR
ADRENÉRGICO BETA 3 Y UN AGENTE ANTIMUSCARÍNICO

Clasificación Internacional (51) A01N 57/00

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 07, 2009

(31) Número de Solicitud

61/249.386

9

Comprobante de pago No. 12-

Fecha Abril de 2012



ANEXOS

2



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. **10-030 403**



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES PCT/US2010/050328

NAGABUKURO, Hiroshi

33 Avenue Louis Pasteur,
Boston, Massachusetts 02115-5727
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Japonesa

EDMONDSON, Scott, D.

126 East Lincoln Avenue,
Rahway, New Jersey 07065-0907
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SINHAROY, Mary, Struthers

126 East Lincoln Avenue,
Rahway, New Jersey 07065-0907
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

DENNEY, William, S.

770 Sumneytown Pike West
Point Pennsylvania 19486
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

FRENKL, Tara, L.

P.O. Box 1000,
Upper Gwynedd,
Pennsylvania 19454
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0028404	
				Bogotá D.C., Marzo 22 de 2012 - 09:22:56	
RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS				NI 830.122.870	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	445217813	21/03/2012	9.410.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN		590.000.00	590.000.00
					\$590.000.00
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-056870- -00000-0000 Fecha: 2012-04-04 15:15:28 Tra. 11 PATENTEIYII Act. 411 PRESENTACION Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Eve: 378 FASENACIONALI Folios: 93					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Marzo 22 de 2012 - 09:22:58					

WK 11657662



2 copia

18 ENE 2010

.. ESCRITURA PUBLICA NUMERO:(0 0 2 6)

CERO CERO VEINTISEIS. /-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito

Capital, República de Colombia, a los

Quince ----- (15) días del mes de

Enero ----- del año dos mil diez -----

(2010), ante mí MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

-----NOTARIA(O) CUARENTA Y
SEIS (46) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura
pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION POR CARLOS
REINALDO OLARTE GARCIA, JAMES IAN RAISBECK
LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, Y NATALIA
CASTRO VELEZ -----

C.C. Nos. 79.782.747, 79.376.996, 80.412.281 Y 52.008.577.-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de
edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con
sociedad conyugal vigente, JAMES IAN RAISBECK LLINAS
mayor de edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la
cédula de ciudadanía número 79.376.996, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente, JUAN GUILLERMO MOURE
PEREZ, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la
cédula de ciudadanía número 80.412.281, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente y NATALIA CASTRO VELEZ,
mayor de edad, vecina de Bogotá, identificada con la cédula de
ciudadanía número 52.008.577, de estado civil casada con
sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y
dijeron:-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

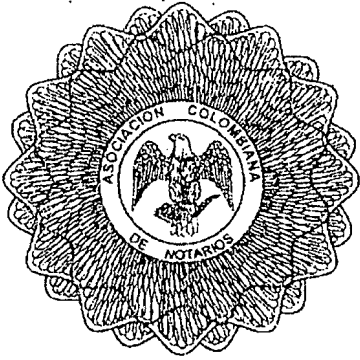
PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cuatro (4) folios autenticados, un poder, y sus traducciones el cual es del siguiente tenor: --

PODER GENERAL.-----

El suscrito, MERCK SHARP & DOHME, CORP domiciliado en 126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907 United States of America nombramos por el presente a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la república de Bolivia, La República del Ecuador, la Republica del Perú y la Republica Bolivariana de Venezuela ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al

WK 11657663

6



otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que expresa la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin todas las

medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses- -----

Firma X (ilegible) Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents.-

Fecha November 19⁸ 2009 -----

Ciudad País: Rahway, NJ, USA.-----

Certificación Notarial- -----

En esta fecha, November 19 -----

El notario Público suscrito Certifica: -----

1. Que Mark R. Daniel mayor de edad y domiciliado 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA suscribió el documento que antecede -----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de Managing Counsel, Patents of MERCK SHARP & DOHME CORP, -----

3. Que MERCK SHARP & DOHME con sede principal en 126 East Lincoln Avenue Rahway, NJ 07065-0907, United States of America esta legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden el objeto social. --

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima. -----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos. (Sigue texto sin traducir)-----

Traducción oficial de un documento cuyo original está en

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

inglés.-----

APOSTILLA

(Convención de la Haya du 5 octubre 1961)

1. País: Distrito de Columbia Estados Unidos de América-----
- El presente documento público-----
2. ha sido firmado Por: Violet Burgess-----
3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey. ---
4. Lleva el sello/ estampilla de: Violet Burgess, Notario.-----

Certificado

- 5 En: ----- Trenton, New Jersey
6. El: ----- 25 de noviembre de 2009
7. Por: ----- R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey
8. Bajo el No.: ----- A380889
9. Sello/ estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"
10. Firma: ----- (Firmado)

Certificación: -----

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.-----

Documento: "Apostilla"-----

Fecha: 11 de Diciembre de 2009.-----

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia).-----

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá D.C.-----

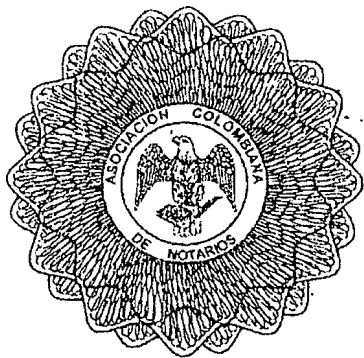
Teléfonos (571) 218 23 08 (571) 623 29 25.- -----

E-mail: treser1@yahoo.com-----

Traducción # 14-278.- -----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de

WK 11657664



su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

La notaría advierte a los interesados que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.-----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaría no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos. (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).-----

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos

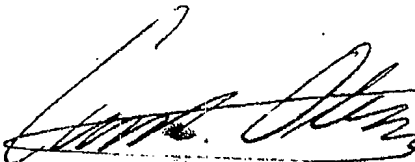
ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de papel
Notarial Nos .WK 11657662, WK 11657663, WK 11657664 Y WK 11657665. /-

DERECHOS LEGALES: \$ 42.860.00. - / - - - - -

RESOLUCIONES 9306 Y 9500 DE 2008 - - - - -

IVA \$ 11.682.00. - / - - - - -



CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79.782.747 Btd

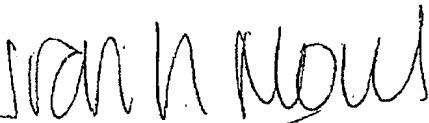
TEL: 6017700



JAMES IAN RAISBECK LLINAS

C.C.No. 79.376.996 Btd

TEL: 6017700



JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ

C.C.No. 80412281

TEL: 6017700



NATALIA CASTRO VELEZ,

C.C.No. 5200857.

TEL: 6017700

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés

Apostilla:

APOSTILLA:
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público

2. Ha sido firmado por: Violet Burgess

3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey

4. Lleva el sello/estampilla de: Violet Burgess, Notario

Certificado

5. En: Trenton, New Jersey

6. El: 25 de noviembre de 2009

7. Por: R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey

8. Bajo el No.: A380889

9. Sello / estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"

10. Firma: (Firmado)

Certificado No. 115832008
Verifique este certificado por internet en:
https://www1.state.nj.us/TYTR-StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Apostilla"

Fecha: 11 de diciembre de 2009.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: jeserres1@yaho.com

Traducción # 14-278

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 DIC 19 A 12:07

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

003841

Jorge Sierra
CUNA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

The undersigned

General Power

El suscrito,

Poder General

MERCK SHARP & DOHME CORP.

domiciled in

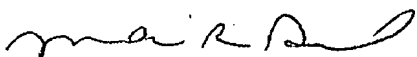
domiciliado en

126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907

United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvénir, contestar demandas y reconvenções; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.



Signature/Firma: X

Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents

Date/Fecha: November 17,

2009

City, Country/Ciudad, País: Rahway, NJ, USA

Diagonal 34 N° 5 - 28, Bogotá D.C., Colombia

Tel + 57 1 601-7700, Fax + 57 1 601-7799, office@olarteraisbeck.com, www.olarteraisbeck.com

RODRIGA GUARENTA Y SEIS
AGUI LUZ ARIETOR LOZANO

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date, November 17
2009
The undersigned Notary Public certifies:

1. That
Mark R. Daniel
of legal age and domiciled in
126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA.
signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing
document as Managing Counsel, Patents
of MERCK SHARP & DOHME CORP.
3. That MERCK SHARP & DOHME
CORP,
having its principal place of business located in
126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ
07065-0907, United States of America
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.
4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.
5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):
Corporate Resolution No. 5 - Patent
Matters adopted November 3, 2009

Violet Burgess
NOTARY PUBLIC (Signature):

VIOLET BURGESS
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires May 30, 2012

Certificación Notarial

En esta fecha,
el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
Mark R. Daniel
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de
4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.
4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.
5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
VIOLET BURGESS
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
VIOLET BURGESS, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 25TH DAY OF NOVEMBER 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO: A380889
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



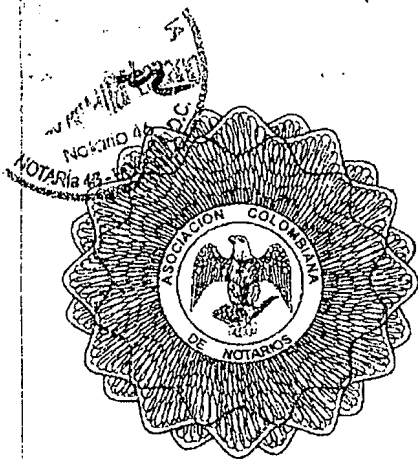
[Handwritten signature]

NOTARIA CUARENTA Y SEIS
Hella Luz Altamir Lozano

Certificate Number: 115832008

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

WK 11657665



ESTA HOJA HACE PARTE DE LA
ESCRITURA PUBLICA NUMERO: (0 0 2 6)
DE FECHA: 15 DE ENERO DE 2.010. - - - -
NOTARIA CUARENTA Y SEIS (46) DE BOGOTA
REFERENTE A LA
PROTOCOLIZACION DE CARLOS
REINALDO OLARTE GARCIA,

JAMES IAN RAISBECK LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE
PEREZ, Y NATALIA CASTRO VELEZ. - - - - -

Maria Eugenia Rojas de Urqueta
MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA
NOTARIA(O) CUARENTA Y SEIS (46) D
redb.



Tomada y Tercera 3ª
fotocopia de la Escritura Pública No. 26
de fecha 15 de Enero de 2010
Tomada de su original que expide en
Siete (7) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado
Dado en Bogotá, D.C., a 10 MAR. 2010
La Notaria Cuarenta y Seis de Bogotá, D.C.

Felicia Luz Altamirano



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 April 2011 (14.04.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/043942 A1

(51) International Patent Classification:
A01N 57/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/050328

(22) International Filing Date:
27 September 2010 (27.09.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/249,386 7 October 2009 (07.10.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK SHARP & DOHME CORP.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **NAGABUKURO, Hiroshi** [JP/US]; 33 Avenue Louis Pasteur, Boston, Massachusetts 02115-5727 (US). **EDMONDSON, Scott, D.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **SINHAROY, Mary, Struthers** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **DENNEY, William, S.** [US/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US). **FRENKL, Tara, L.** [US/US]; P.O. Box 1000, Upper Gwynedd, Pennsylvania 19454 (US).

(74) Common Representative: **MERCK SHARP & DOHME CORP.**; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

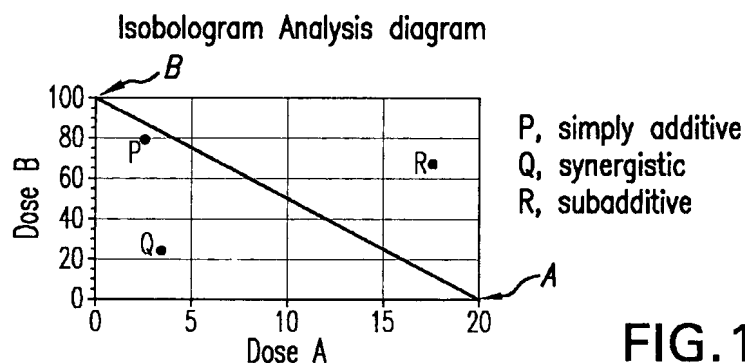
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMBINATION THERAPY USING A BETA 3 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND AN ANTIMUSCARINIC AGENT



(57) Abstract: Described herein is an improved method of treating overactive bladder, wherein the method comprises administering to a patient in need thereof a beta 3 adrenergic receptor agonist, an antimuscarinic agent, and an optional selective M₂ antagonist. Such combination therapy provides improved efficacy and/or reduced side effects.

TITLE OF THE INVENTION

COMBINATION THERAPY USING A BETA 3 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND AN ANTIMUSCARINIC AGENT

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

The function of the lower urinary tract is to store and periodically release urine. This requires the orchestration of storage and micturition reflexes which involve a variety of afferent and efferent neural pathways, leading to modulation of central and peripheral neuroeffector mechanisms, and resultant coordinated regulation of sympathetic and
10 parasympathetic components of the autonomic nervous system as well as somatic motor pathways. These proximally regulate the contractile state of bladder (detrusor) and urethral smooth muscle, and urethral sphincter striated muscle.

Overactive bladder (OAB) is characterized by the symptoms of urinary urgency, with or without urgency urinary incontinence, usually associated with frequency and nocturia.

15 The prevalence of OAB in the United States and Europe has been estimated at 16 to 17% in both women and men over the age of 18 years. Overactive bladder is most often classified as idiopathic, but can also be secondary to neurological condition, bladder outlet obstruction, and other causes. From a pathophysiologic perspective, the overactive bladder symptom complex, especially when associated with urge incontinence, is suggestive of detrusor overactivity.

20 Urgency with or without incontinence has been shown to negatively impact both social and medical well-being, and represents a significant burden in terms of annual direct and indirect healthcare expenditures.

Anti-muscarinic agents have been used for treating incontinence conditions such as OAB. For example, tolterodine, or (R)-N,N-diisopropyl-3-(2-hydroxy -5-methylphenyl)-3-
25 phenylpropanamine, has been marketed for the treatment of urge incontinence and other symptoms of unstable or overactive urinary bladder. Both tolterodine and its major active metabolite, the 5-hydroxymethyl derivative of tolterodine, are thought to contribute to the therapeutic effect. However, current medical therapy for OAB using anti-muscarinic agents often is suboptimal, as many patients either do not demonstrate an adequate response to current
30 treatments, and/or are unable to tolerate the considerable side effects such as dry mouth with the current treatments.

Therefore, there is a continuing need for improved therapies that provide more effective treatment of OAB and/or reduced side effects.

35 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGURE 1 (FIG. 1) is a diagram showing the isobologram analysis.

FIGURE 2 (FIG. 2) is a diagram showing the isobolograms of the inhibition of

detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 with tolterodine (A), oxybutynin (B) or darifenacin (C).

FIGURE 3 (FIG. 3) is a diagram showing the isobolograms of the inhibition of
5 detrusor contraction induced by the combinations of Compound 12, and tolterodine (A) and darifenacin (B).

FIGURE 4 (FIG. 4) is a diagram showing CL316243 with or without pre-
treatment of methoctramine.

FIGURE 5 (FIG. 5) is a diagram showing the isobolograms of the inhibition of
10 detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 and darifenacin with (A) or without (B) a pretreatment of methoctramine.

FIGURE 6 (FIG. 6) is a diagram showing the isobolograms of the inhibition of
15 detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 and oxybutynin at different ratios.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 It has now surprisingly been found that a combination therapy using a beta 3 adrenergic receptor agonist (hereinafter, " β_3 -AR agonist"), an antimuscarinic agent, and an optional selective M_2 antagonist provides synergistic effect for treating overactive bladder. Combination compositions comprising a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent and an optional selective M_2 antagonist are also described.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

25 Described herein is a method of treating overactive bladder, wherein the method comprises administering to a patient in need thereof a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent, and an optional selective M_2 antagonist. Such combination therapy provides synergistic effect
30 and thus improved efficacy and/or reduced side effects.

It has now surprisingly been found that the M_2 antagonism of an antimuscarinic agent may play an important role in providing synergy for treating OAB in a combination therapy comprising a β_3 -AR agonist and the antimuscarinic agent. While not wishing to be bound by theory, it is generally believed that the M_3 antagonism of an antimuscarinic agent is
35 important for OAB efficacy (see, for example, Abrams and Andersson. BJU Int, 100, 987-1006 (2007)). It has now been found that the M_2 antagonism, working together with the M_3 antagonism and a β_3 -AR agonist, provides synergy.

In one embodiment, a synergistic effect is obtained in a combination therapy comprising a β_3 -AR agonist and an antimuscarinic agent wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 40. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 20.

5 Additionally, in a case where an antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than 40, synergy may be obtained by using an additional selective M_2 antagonist in a combination therapy comprising a β_3 -AR agonist and the antimuscarinic agent.

As used herein, the term "synergy" or "synergistic effect" is used to describe a situation where the combined effect of two or more active agents is greater than the sum of the
10 individual active agents. In other words, two or more active agents can interact in ways that the presence of one active agent enhances or magnifies the effects of the second. In contrast, where the combined effect of two or more active agents substantially equals to the sum of the individual active agents, the combined effect is simply additive, but not synergistic. And where the combined effect of two or more active agents is less than the sum of the individual active
15 agents, the combined effect is sub-additive, also not synergistic.

In one embodiment, the combination therapy comprises administering to a patient in need thereof a β_3 -AR agonist and an antimuscarinic agent, wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 40. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 30. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an
20 M_2/M_3 ratio of less than about 20. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 15. In yet another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than about 10. In still another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of about 1.

In another embodiment, the antimuscarinic agent in the combination therapy has
25 an M_2/M_3 ratio of greater than about 0.1. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than about 0.5. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than about 0.8.

In another embodiment, the antimuscarinic agent in the combination therapy has an M_2/M_3 ratio of from about 0.1 to about 40. In another embodiment, the antimuscarinic agent
30 has an M_2/M_3 ratio of from about 0.5 to about 30. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of from about 0.8 to about 20. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of from about 1 to about 20. In yet another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of from about 1 to about 15. In still another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of from about 1 to about 10.

35 In one embodiment, the M_2/M_3 ratio is measured using the receptor binding assays described in Ohtake et al. (Biol. Pharm. Bull. 30, 54 - 58, 2007), which is incorporated herein by reference in its entirety. In another embodiment, the M_2/M_3 ratio is measured using

the assays described in Hegde et al. (Curr Opin Invest Drugs. 5, 40-49 (2004), which is incorporated herein by reference in its entirety.

The $M_1 - M_4$ activities of some exemplary antimuscarinic agents reported in Ohtake et al. (Biol. Pharm. Bull. 30, 54-58 (2007)) are shown in Table 1.

5 Table 1. $M_1 - M_4$ Activities of Some Exemplary Antimuscarinic Agents – Ohtake et al.

Antimuscarinic Agent	Ki (nM)				
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_2/M_3 ratio
Tolterodine	2.7±0.23	4.2±0.51	4.4±0.45	6.6±1.7	1
Oxybutynin	6.1±1.5	21±3.6	3.4±0.65	6.6±2.7	6
Darifenacin	31±2.6	100±14	2.0±0.21	52±15	50
Solifenacin	26±2	170±37	12±4.4	110±45	14
Propiverine	490±110	1400±220	350±53	900±200	4

Hegde et al. (Curr Opin Invest Drugs. 5, 40-49 (2004)) described $M_1 - M_4$ activities of some antimuscarinic agents and the $M_1 - M_4$ activities of trospium are shown in Table 2.

10 Table 2. M_2 and M_3 Activities of Trospium – Hegde et al.

Antimuscarinic Agent	Ki (nM)				
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_2/M_3 ratio
Trospium	0.75	0.65	0.5	1	1

Suitable anti-muscarinic agents for the combination therapy include, but are not limited to: tolterodine, oxybutynin (including S-oxybutynin), hyoscyamine, propantheline, propiverine, trospium (including trospium chloride), solifenacin, darifenacin, dicyclomine, ipratropium, oxytrol, imidafenacin, fesoterodine, temiverine, SVT-40776, 202405 by GlaxoSmithKline, TD6301, RBX9841, DDP200, and PLD179.

15 In one embodiment, the anti-muscarinic agent is selected from the group consisting of: tolterodine, fesoterodine, oxybutynin, solifenacin, propiverin, trospium, imidafenacin, and TD6301. In one embodiment, the M_2/M_3 ratio of the suitable anti-muscarinic agent is less than 40. In another embodiment, the M_2/M_3 ratio is less than 30. In another
20 embodiment, the M_2/M_3 ratio is less than 20. In yet another embodiment, the M_2/M_3 ratio is less than 15. In one embodiment, the M_2/M_3 ratio is measured using the binding assays described in Ohtake et al.

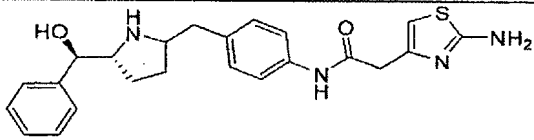
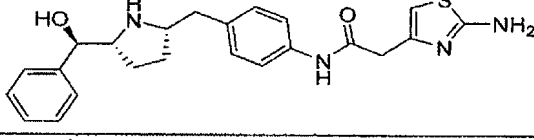
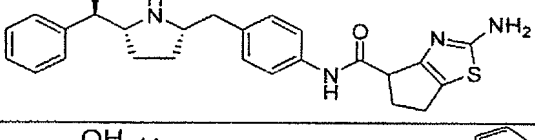
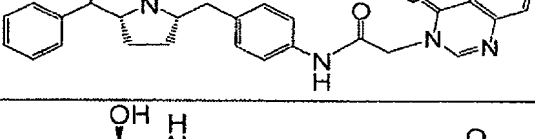
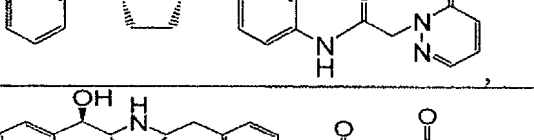
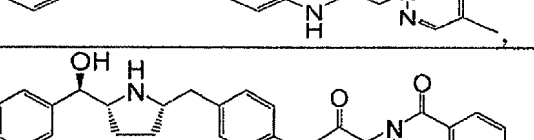
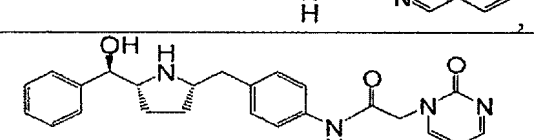
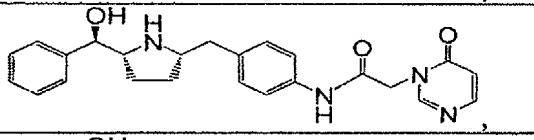
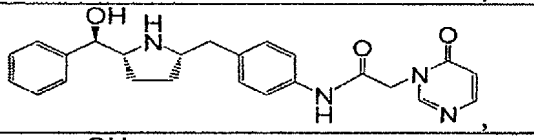
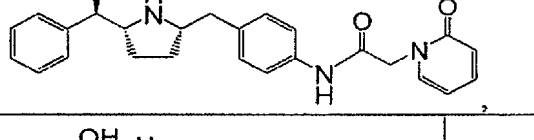
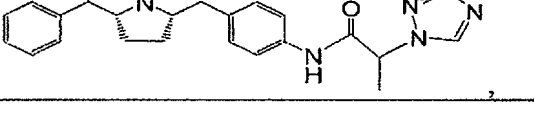
In another embodiment, the anti-muscarinic agent is selected from the group consisting of: tolterodine, fesoterodine, oxybutynin, solifenacin, propiverine, and trospium.

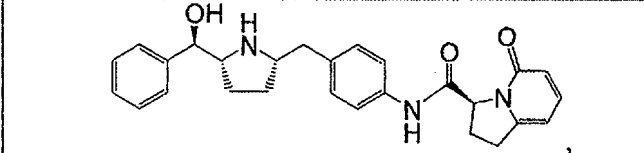
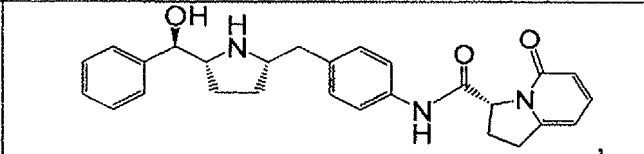
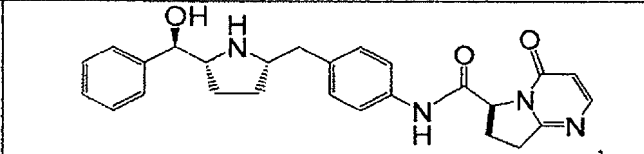
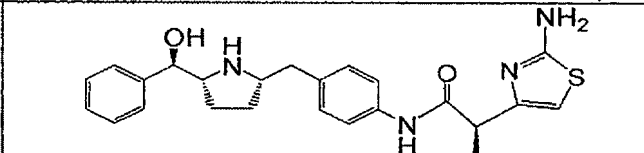
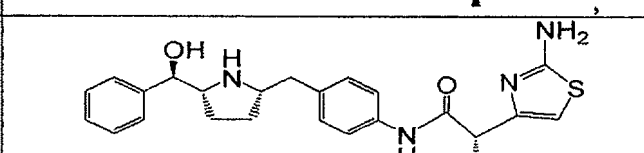
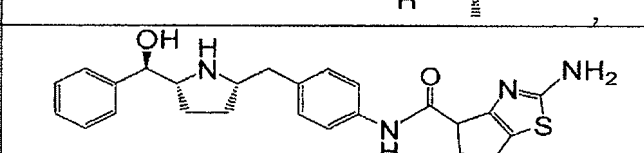
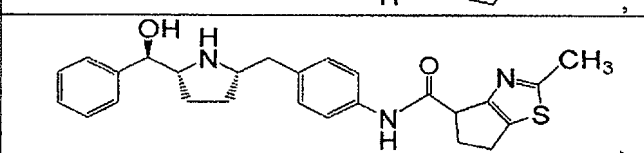
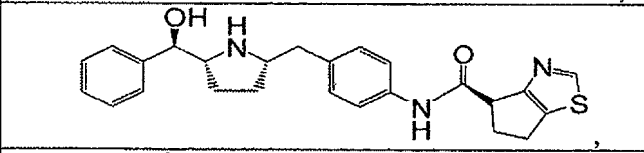
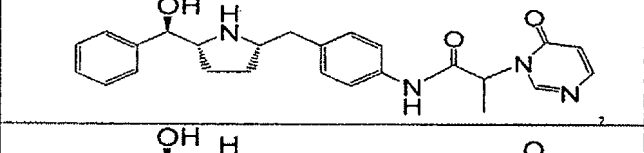
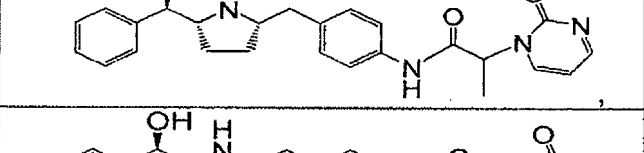
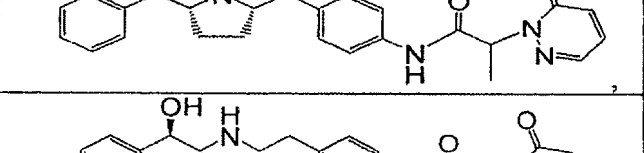
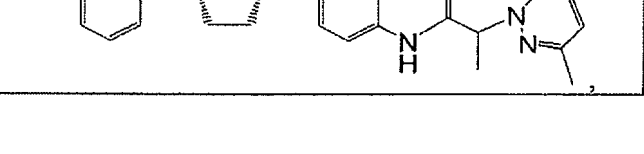
25 In another embodiment, the anti-muscarinic agent is selected from the group consisting of: tolterodine and oxybutynin.

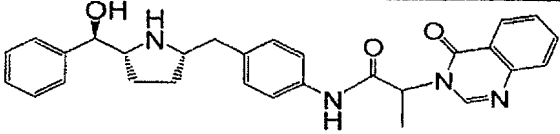
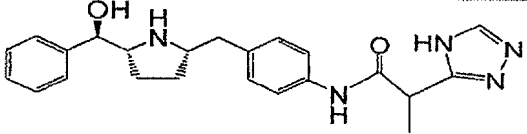
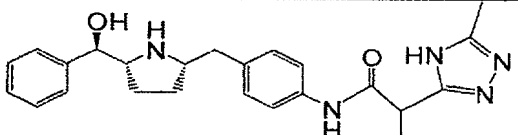
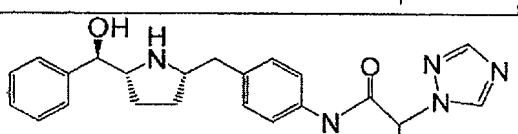
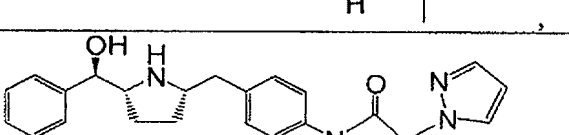
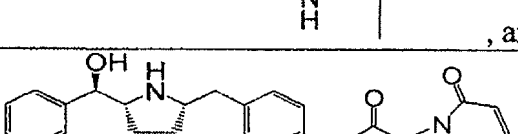
In yet another embodiment, the anti-muscarinic agent is tolterodine.

Suitable β_3 -AR agonists include, but are not limited to, CL316243, and compounds shown in Table 3.

Table 3. Suitable β_3 -AR agonists for combination therapy.

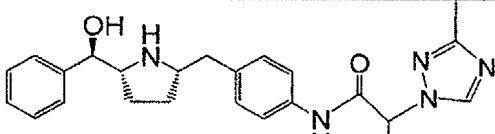
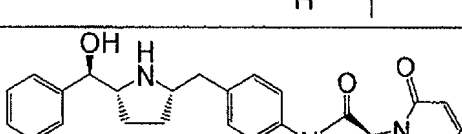
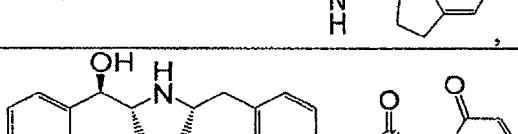
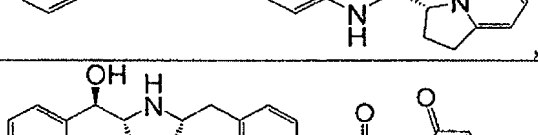
Compound #	Structure
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

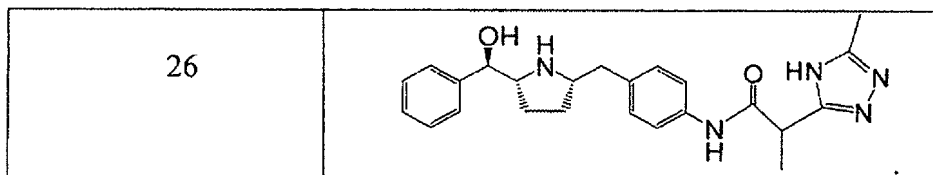
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	

24	
25	
26	
27	
28	
29	

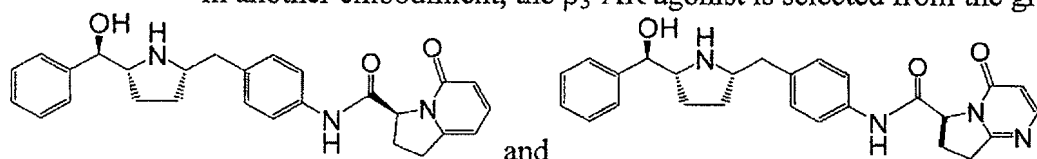
In another embodiment, the β_3 -AR agonist is selected from the compounds listed in Table 4:

Table 4. Suitable β_3 -AR agonists for combination therapy.

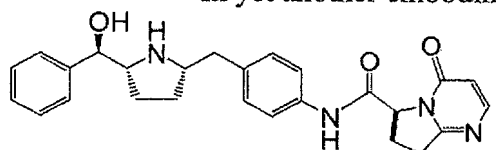
Compound #	Structure
11	
12	
13	
14	



In another embodiment, the β_3 -AR agonist is selected from the group consisting of



In yet another embodiment, the β_3 -AR agonist is



Compounds in Table 3 can be prepared using procedures as described below.

Throughout the application, the following terms have the indicated meanings unless otherwise noted:

<u>Term</u>	<u>Meaning</u>
Ac	Acyl ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$)
Aq.	Aqueous
Bn	Benzyl
BOC (Boc)	t-Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
Calc. or calc'd	Calculated
Celite	Celite TM diatomaceous earth
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyl-ethylamine
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
Eq. or equiv.	Equivalent(s)
ES-MS and ESI-MS	Electron spray ion-mass spectroscopy
Et	Ethyl
EtOAc	Ethyl acetate

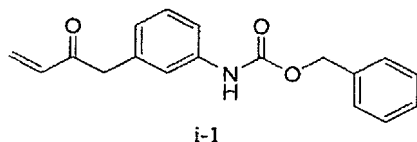
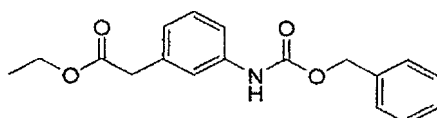
	g	Gram(s)
	h or hr	Hour(s)
	HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
5	HOAc	Acetic acid
	HOAT	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
	HOBT	1-Hydroxybenzotriazole
	HPLC	High performance liquid chromatography
	LC/MS or LC-MASS	Liquid chromatography mass spectrum
10	L	Liter(s)
	M	Molar(s)
	Me	Methyl
	MeOH	Methanol
	MF	Molecular formula
15	min	Minute(s)
	mg	Milligram(s)
	mL	Milliliter(s)
	mmol	Millimole(s)
	MOZ (Moz)	<i>p</i> -Methoxybenzyloxycarbonyl
20	MP	Melting point
	MS	Mass spectrum
	nM	Nanomolar
	OTf	Trifluoromethanesulfonyl
	Ph	Phenyl
25	Prep.	Preparative
	Ref.	Reference
	r.t. or rt	Room temperature
	Sat.	Saturated
	SCF CO ₂ S	Super critical fluid carbon dioxide
30	TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
	TBAI	Tetrabutylammonium iodide
	TBDPS	<i>Tert</i> -butyl diphenylsilyl
	TBS, TBDMS	<i>Tert</i> -butyl dimethylsilyl
	TEA or Et ₃ N	Triethylamine
35	Tf	Triflate or trifluoromethanesulfonate
	TFA	Trifluoroacetic acid
	THF	Tetrahydrofuran
	TLC	Thin-layer chromatography

TMS

Trimethylsilyl

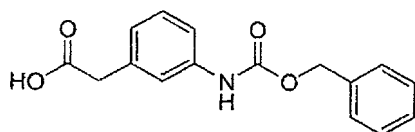
INTERMEDIATE 1

Benzyl [3-(2-oxobut-3-en-1-yl)phenyl] carbamate (i-1):

Step A: Ethyl (3-[(benzyloxy)carbonyl]amino}phenyl) acetate

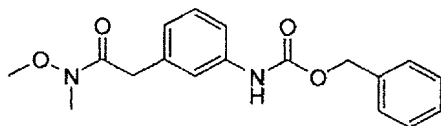
To a solution of methyl (3-aminophenyl) acetate (25g, 140 mmol) in 250 mL anhydrous DCM was added DIEA (28.5 mL, 155 mmol) and the resulting solution cooled to 0°C and set under nitrogen atmosphere. To this cooled solution was then added benzyl chloroformate (21.1 mL, 148 mmol) and the resulting mixture stirred overnight allowing to warm to room temperature. The reaction was washed with 1 M HCl, water, and then brine. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. No further purification was necessary and the material (44g, 99%) was used as is for the next step reaction. LC-MS:

m/z (ES) 314 (MH)⁺, 336 (MNa)⁺.

Step B: (3-[(Benzyloxy)carbonyl]amino}phenyl) acetic acid

To a solution of 44.0 g (140 mmol) of ethyl (3-[(benzyloxy)carbonyl]amino}phenyl) acetate (from Step A) in THF, ethanol, and water (1:1:1, 1500 mL) was added solid LiOH (16.8 g, 700 mmol) and the resulting solution heated to 60°C via oil bath for 3 h. The mixture was cooled to room temperature overnight and then 40 mL of concentrate HCl was slowly added, keeping the temperature below 25°C, until the solution was about pH of 2-3. Extract with ethyl acetate (3 x 750 mL) and then combine and wash organics with water and then brine. Dry organics over sodium sulfate, filter and concentrate under vacuum. The title compound (24.7 g, 87%) was used for the next step reaction without further purification. LC-MS: m/z (ES) 286 (MH)⁺, 308 (MNa)⁺.

Step C: Benzyl (3-{2-[methoxy(methyl)amino]-2-oxoethyl}phenyl)carbamate



To a suspension of 24.7 g (87 mmol) of (3-{{[(benzyloxy)carbonyl]amino}phenyl)acetic acid in 200 mL of dichloromethane (from Step B) was added triethylamine (30.2 mL, 173 mmol) which resulted in some exotherming (+5°C) and the suspension becoming a solution.

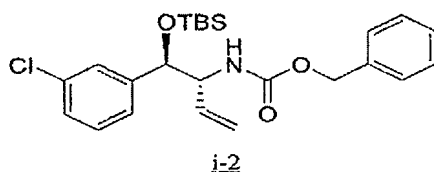
- 5 After 10 min cooling, HOBt (13.2 g, 87 mmol), N,O- dimethylhydroxylamine HCl (8.5 g, 87 mmol) was added to the solution followed by EDC (16.6g, 87 mmol) and the resulting mixture stirred at room temperature overnight under nitrogen atmosphere. The solution was transferred to a separatory funnel and washed with 1 M HCl which caused an emulsion. Methanol was added to break up the emulsion and the aqueous was partitioned off. The organics were dried
10 over sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. Recrystallization of the residue from 1000 mL of 70% hexane in ethyl acetate (heated to reflux and then cooled to room temperature overnight) afforded the title compound (21 g, 74%) as a white solid. LC-MS: m/z (ES) 329 (MH)⁺.

15 Step D: Benzyl [3-(2-oxobut-3-en-1-yl)phenyl] carbamate (i-1)

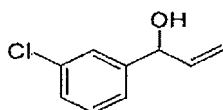
- To a solution of 15g (45.7 mmol) of benzyl (3-{2-[methoxy(methyl)amino]-2-oxoethyl}phenyl)carbamate (from Step C) in 1000 mL anhydrous THF under nitrogen atmosphere cooled to 0°C via ice/water bath was added dropwise via cannula a 1.0 M solution of vinyl magnesium bromide (100 mL in THF, 100 mmol) and the resulting solution stirred for 1 h
20 at 0°C. The reaction was quenched by a slow addition of 500 mL 1 M HCl keeping the temperature below 5°C and stirred for 30 min. The mixture was then extracted with ethyl acetate and the combined organics washed with water followed by brine. The organics were then dried over sodium sulfate, filtered, and concentrate under vacuum. The residue was purified by Biotage 75M flash eluting with 30% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (11 g,
25 78%) as a light yellow solid. LC-MS: m/z (ES) 310 (MH)⁺, 332 (MNa)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.44-7.36 (m, 7H), 7.18 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.70 (br s, 1H), 6.44 (dd, J = 10.5, 17.6 Hz, 1H), 6.32 (dd, J = 1.1, 17.6 Hz, 1H), 5.85 (dd, J = 1.1, 10.5 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.86 (s, 2H).

30 INTERMEDIATE 2

((1R)-1-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]prop-2-en-1-yl} carbamate (i-2)

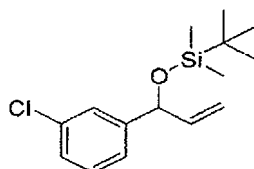


Step A: 1-(3-Chlorophenyl)prop-2-en-1-ol



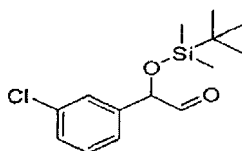
To a cooled solution of 3-chlorobenzaldehyde (22.5 g, 160 mmol) in 100 mL anhydrous THF under inert nitrogen atmosphere was added slowly via syringe a 1.6 M solution of vinyl magnesium chloride in THF (100 mL, 160 mmol) and the solution stirred for three h allowing to warm to room temperature. The reaction was quenched with saturated solution of ammonium chloride and the organic layer was separated, extracted with ethyl acetate (2 x 200 mL), and organic layers were combined, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. Purification by Horizon MPLC with a 40M+ silica gel column using a gradient eluent of 0-40% ethyl acetate in hexane afforded the title compound (22.4 g, 44%). m/z (ES) 168, 170 (M, M+2)⁺, 190, 192 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.38 (s, 1H), 7.35-7.22 (m, 3H), 5.90 (ddd, J = 7.3, 10.0, 17.4 Hz, 1H), 5.38 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 0.96 (s, 9H), 0.18 (s, 3H), 0.08 (s, 3H).

Step B: Tert-butyl {[1-(3-chlorophenyl)prop-2-en-1-yl]oxy}dimethylsilane



To a solution of 22.4 g (133 mmol) of 1-(3-chlorophenyl)prop-2-en-1-ol in 90 mL anhydrous DMF (from Step A) was added t-butyldimethylsilyl chloride (20.0 g, 133 mmol) and imidazole (18.1 g, 266 mmol) and the resulting solution was stirred overnight under nitrogen at room temperature. Wash with water and extract with ethyl acetate. Separate organics, dry over magnesium sulfate, filter, and concentrate under vacuum. The residue was purified by flash silica gel column eluting with a gradient eluent of 0-15% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (16.6 g, 46%). m/z (ES) 282, 284 (M, M+2)⁺; 151, 153 (M-OTBS, M-OTBS+2)⁺.

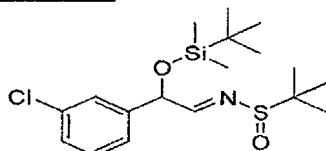
Step C: {[Tert-butyl (dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)acetaldehyde



To a solution of 4.0g (14.2 mmol) of tert-butyl {[1-(3-chlorophenyl)prop-2-en-1-yl]oxy}dimethylsilane in dichloromethane cooled to -78°C via dry ice/acetone bath (from Step B) was bubbled ozone until the solution maintained a slight blue color. Nitrogen gas was then bubbled into the solution until it turned clear. Methyl sulfide was added to the solution and the resulting mixture was allowed to stir overnight at room temperature. The material was concentrated under vacuum and the residue purified via Horizon MPLC with a 40M+ silica gel

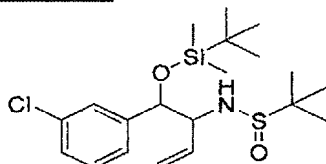
column, eluting with a gradient eluent of 0-50% ethyl acetate in hexane to afford the product (3.57 g, 89%).

Step D: N-[(1E)-2-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(3-chlorophenyl)ethylidene]-2-methylpropane-2-sulfinamide



To a solution of 3.0 g (10.6 mmol) of {[*tert*-butyl (dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)acetaldehyde (from Step C) and 1.3 g (10.6 mmol) of (R or S)-2-methyl-2-propanesulfinamide in 50 mL anhydrous dichloromethane was added copper(II) sulfate (3.4 g, 21.2 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 16 h. Wash reaction with water and extract with dichloromethane. Dry the organics with magnesium sulfate, filter and concentrate under vacuum. The residue was purified by Horizon MPLC, with a 40M+ silica gel column, eluting with a gradient eluent system of 0-25% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (3.26 g, 80%). m/z (ES) 387, 390 (M, M+2)⁺.

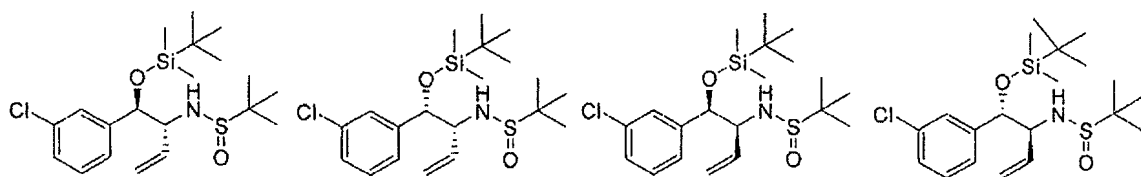
Step E: N-{1-[{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]-prop-2-en-1-yl}2-methylpropane-2-sulfinamide



To a solution of 2.4 g (6.20 mmol) of N-[(1E)-2-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(3-chlorophenyl)ethylidene]-2-methylpropane-2-sulfinamide in 20 mL anhydrous THF cooled to 0°C under nitrogen atmosphere (from Step D) was added a 1.6 M solution of vinyl magnesium chloride in THF (3.90 mL, 6.2 mmol) via syringe and the resulting mixture stirred for 1 h. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for an additional hour. The reaction was quenched with saturated solution of ammonium chloride and extract with ethyl acetate.

Combine organics, dry over magnesium sulfate, filter and concentrate under vacuum. The residue was purified by Horizon MPLC, with a 40M+ silica gel column, eluting with a gradient eluent system of 0-35% ethyl acetate in hexane to afford all four diastereomers as single isomers.

By NMR the four products obtained were diastereomers of each other. The isomers were labeled as they eluted off the silica gel column. The first isomer that eluted off was named isomer 1 and then isomers 2, 3 and lastly isomer 4.



Isomer 1: m/z (ES) 416, 418 (M, M+2)⁺, 438, 440 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (s, 1H), 7.30 (br d, J = 7.5, 1H), 7.26 (br d, J = 6.2 Hz, 2H), 7.22-7.18 (m, 1H), 5.60 (ddd, J = 7.3, 10.3, 17.4 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.98-3.94 (m, 2H), 1.64 (br s, 1H), 1.23 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), -0.18 (s, 3H).

Isomer 2: m/z (ES) 416, 418 (M, M+2)⁺, 438, 440 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.33-7.31 (m, 2H), 7.26 (br d, J = 5.0 Hz, 2H), 7.20-7.16 (m, 1H), 5.44 (ddd, J = 7.2, 10.0, 17.4 Hz, 1H), 5.26 (overlapping d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.25 (overlapping d, J = 17.3 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 4.02 (dt, J = 4.4, 7.8 Hz, 1H), 3.80 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 1.20 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), -0.12 (s, 3H).

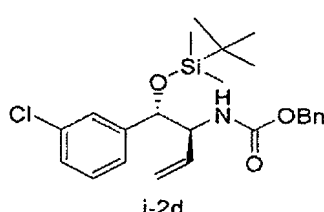
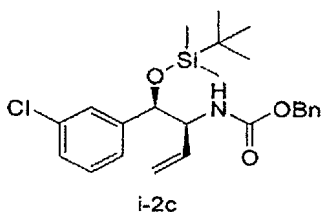
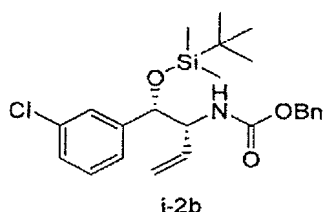
Isomer 3: m/z (ES) 416, 418 (M, M+2)⁺, 438, 440 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.32-7.29 (m, 2H), 7.26-7.24 (m, 2H), 7.22-7.20 (m, 1H), 6.04 (ddd, J = 7.1, 10.4, 17.4 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 3.88-3.80 (m, 1H), 3.55 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 1.09 (s, 9H), 0.95 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), -0.10 (s, 3H).

Isomer 4: m/z (ES) 416, 418 (M, M+2)⁺, 438, 440 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (s, 1H), 7.30 (br d, J = 7.5, 1H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.21-7.18 (m, 1H), 5.92 (ddd, J = 7.1, 10.3, 17.4 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.33 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), -0.14 (s, 3H).

Step F: ((1*R*)-1-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]prop-2-en-1-yl} carbamate (i-2)

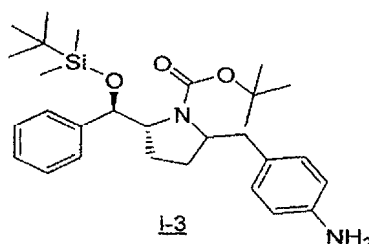
To isomer 1 (510 mg, 2.22 mmol) of N-{1-[[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]-prop-2-en-1-yl}2-methylpropane-2-sulfinamide (from Step E) was added 5 mL anhydrous 4 M HCl in dioxane and the solution stirred for 15 min at room temperature. The reaction was concentrated to dryness and azeotroped with toluene (2 x 5 mL) to remove excess HCl. The residue was then taken up in anhydrous dichloromethane, set under nitrogen atmosphere, cooled to 0°C with ice/water bath and then benzyl chloroformate (0.32 mL, 2.22 mmol) was slowly added via syringe followed by diisopropylethyl amine (1.19 mL, 6.66 mmol) and the resulting solution stirred for 2 h at 0°C. The solution was concentrated to dryness under vacuum and the residue was purified via preparative plates (4 x 1000 μ M) eluting with 20% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (703 mg, 71%). m/z (ES) 446, 448 (M, M+2)⁺, 468, 470 (MNa, MNa+2)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (s, 1H), 7.30 (br d, J = 7.5, 1H), 7.27-7.25 (m, 2H), 7.21-7.18 (m, 1H), 5.92 (ddd, J = 7.1, 10.3, 17.4 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 4.75 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.33 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), -0.14 (s, 3H).

Intermediates related to those described above of varying stereochemistry may be prepared from the appropriate starting materials using the procedure described above.

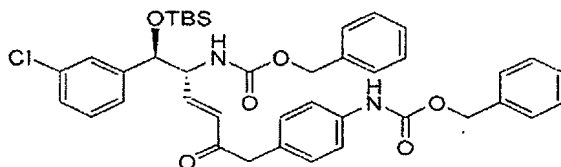
**INTERMEDIATE 3**

Tert-butyl(5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-3)

5



Step A: Benzyl{4-[(3*E*, 5*R*, 6*R*)-5-{[(benzyloxy)carbonyl]amino-6-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-6-(3-chlorophenyl)-2-oxohex-3-en-1-yl]phenyl}carbamate

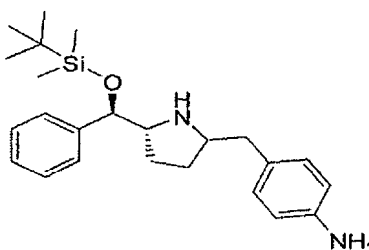


10

To a solution of benzyl [3-(2-oxobut-3-en-1-yl)phenyl] carbamate (i-1) (820 mg, 2.80 mmol) and ((1*R*)-1-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]prop-2-en-1-yl}carbamate (i-2) (500 mg, 1.12 mmol) in 7 mL of anhydrous dichloromethane was added the Zhan I catalyst (740 mg, 1.12 mmol) and the resulting green solution was heated to 40°C overnight under nitrogen atmosphere. The reaction was concentrated to dryness and the residue

15 purified via preparative plates (4 x 1000 μM) eluting with 40% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (348 mg, 50%). *m/z* (ES) 713, 715 (M, M+2)⁺, 735, 737 (MNa, MNa+2)⁺.

Step B: 4-[(5*R*)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl]aniline



20

To a solution of 328 mg (0.46 mmol) of benzyl{4-[(3*E*, 5*R*, 6*R*)-5-{[(benzyloxy)carbonyl]amino-6-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-6-(3-chlorophenyl)-2-oxohex-3-en-1-yl]phenyl}carbamate (from Step A) in 25 mL ethanol was added 10% palladium on

carbon and the suspension was set under hydrogen atmosphere via a balloon of hydrogen gas. The reaction was stirred under hydrogen for 1 h at room temperature. TLC proved that the reaction was complete. The catalyst was filtered off using a Gilmen 0.45 μ M PTFE syringe filter and washed with ethanol (4 x 5 mL). The filtrate was concentrated to dryness under vacuum and the residue purified by preparative plate (3 x 1000 μ M) eluting with 5% methanol in dichloromethane to afford the title compound (121 mg, 66%). m/z (ES) 397 (MH)⁺.

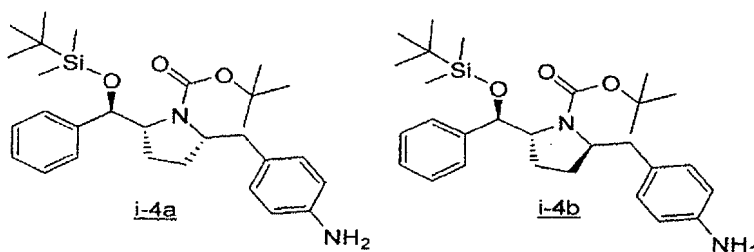
Step C: *Tert*-butyl(5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-3)

To a solution of 121 mg (0.315 mmol) of 4-({(5*R*)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl}methyl)aniline in 5 mL of anhydrous THF (from Step B) was added *tert*-butyl carbonate (69 mg, 0.315 mmol), followed by TEA (44 μ L, 0.315 mmol) and the resulting solution stirred at room temperature under nitrogen atmosphere overnight. The reaction mixture was put directly on a preparative plate (1500 μ M) and eluted with 30% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (100 mg, 64%). m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.40-7.30 (m, 5H), 6.75-6.68 (m, 2H), 6.56-6.51 (m, 2H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.32-5.28 (m, 1H), 4.16-4.06 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.55-3.48 (m, 2H), 2.74 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.50-1.42 (m, 1H), 1.32-1.22 (m, 2H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), -0.15 (s, 3H).

SEPARATION OF INTERMEDIATE 4a AND INTERMEDIATE 4b

Tert-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4a);

Tert-butyl (2*R*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4b)



Step A: *Tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4a) and *tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4b)

The intermediate i-3 (*tert*-butyl(*5R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (4:1 mixture of *cis* and *trans*) was taken up in methanol and purified via the Berger Multigram SFC (supercritical) using an eluent of 30% methanol:60% carbon dioxide to separate the two diastereomers. The first isomer

of the column was labeled minor isomer 1 and the second isomer was labeled major isomer 2.

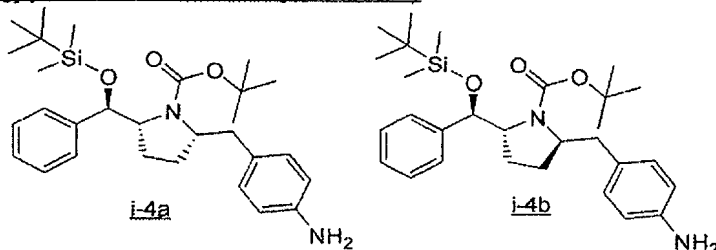
i-4a: m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.40-7.30 (m, 5H), 6.75-6.68 (m, 2H), 6.56-6.51 (m, 2H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.32-5.28 (m, 1H), 4.16-4.06 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.55-3.48 (m, 2H), 2.74 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.50-1.42 (m, 1H), 1.32-1.22 (m, 2H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.92 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 0.12 (br d, J = 14.0 Hz, 3H), -0.04 (s, 3H). Eluted 8.70 min on SFC, isomer 2

i-4b: m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.40-7.30 (m, 5H), 6.76-6.68 (m, 2H), 6.56-6.51 (m, 2H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.32-5.28 (m, 1H), 4.16-4.06 (m, 2H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.60-3.46 (m, 2H), 2.72 (br d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 12.2 Hz, 1H), 2.05-1.94 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.50-1.42 (m, 1H), 1.32-1.22 (m, 2H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.14 (br d, J = 13.8 Hz, 3H), 0.09 (s, 3H). Eluted 7.78 min on SFC, isomer 1.

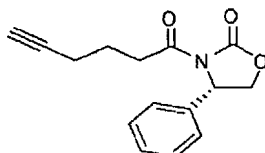
SYNTHESIS OF INTERMEDIATE 4a AND INTERMEDIATE 4b

Tert-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4a);

Tert-butyl (2*R*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4b)



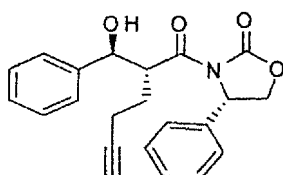
Step A: (4*S*)-3-Hex-5-ynoyl-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one



To a solution of 69.0 g (615 mmol) of 5-hexynoic acid and 214 mL (1540 mmol) of triethylamine in 1.0 L of anhydrous tetrahydrofuran at -25°C under an atmosphere of nitrogen was added 83.0 mL (677 mmol) of trimethylacetyl chloride over 20 min. Upon addition a white precipitate formed and the resulting suspension was stirred for 2 h. Next, 28.7 g (677 mmol) of anhydrous lithium chloride and 100.0 g (615.0 mmol) of (4*S*)-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one were added sequentially and the mixture was allowed to gradually warm to ambient temperature

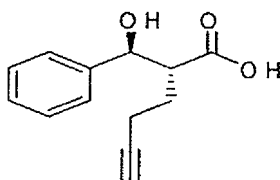
over 12 h. All volatiles were removed *in vacuo* and the residue was diluted with water (1 L) and extracted with ethyl acetate (3 x 300 mL). The combined organic layers were washed with brine (250 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography eluting with a 5-50% ethyl acetate in hexanes gradient to afford the title compound as a colorless solid (135 g, 85.4%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.37 (m, 2H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.31-7.28 (m, 2H), 5.42 (dd, *J* = 8.9, 3.7 Hz, 1H), 4.69 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 9.2, 3.7 Hz, 1H), 3.13-3.02 (m, 2H), 2.24-2.21 (m, 2H), 1.94 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.84 (quintet, *J* = 7.1 Hz, 2H). LC-MS: *m/z* (ES) 258.2 (MH)⁺.

10 Step B: (4*S*)-3-{(2*R*)-2-[(*S*)-Hydroxy(phenyl)methyl]hex-5-ynoyl}-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one



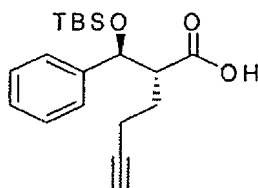
To a stirred solution of 56.8 g (221 mmol) of (4*S*)-3-hex-5-ynoyl-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one from step A above in 265 mL of anhydrous ethyl acetate at ambient temperature under an atmosphere of nitrogen was added 6.31 g (66.2 mmol) of anhydrous magnesium chloride, 61.5 mL (442 mmol) of triethylamine, 26.9 mL (265 mmol) of benzaldehyde and 42.3 mL (331 mmol) of chlorotrimethylsilane and the resulting mixture was stirred for 72 h. The heterogeneous reaction mixture was filtered through a 300 mL plug of silica gel eluting with an additional 1L of ethyl acetate. The filtrate was evaporated to dryness *in vacuo* and the residue suspended in 265 mL of methanol and 10 mL of trifluoroacetic acid. The resulting mixture was stirred at ambient temperature under nitrogen for 5 h during which time the reaction became homogeneous. All volatiles were then removed *in vacuo* and the residue was purified by silica gel chromatography eluting with a 5-15% ethyl acetate in hexanes gradient to afford the title compound as a white solid (65.0 g, 81.2%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.30-7.28 (m, 8H), 7.09-7.07 (m, 2H), 5.42 (dd, *J* = 8.7, 3.7 Hz, 1H), 4.76-4.72 (m, 1H), 4.72-4.67 (m, 1H), 4.65 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 8.7, 3.7 Hz, 1H), 3.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 2.24 (td, *J* = 7.1, 2.5 Hz, 2H), 2.00-1.93 (m, 2H), 1.67-1.61 (m, 1H). LC-MS: *m/z* (ES) 346.1 (MH-H₂O)⁺, 386.0 (MNa)⁺.

30 Step C: (2*R*)-2-[(*S*)-Hydroxy(phenyl)methyl]hex-5-ynoic acid



To a stirred solution of 65.0 g (179 mmol) of (4*S*)-3-{(2*R*)-2-[(*S*)-hydroxy(phenyl)methyl]hex-5-ynoyl}-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one from Step B above in 1050 mL of a 20 to 1 mixture of anhydrous tetrahydrofuran to water at 0 °C under an atmosphere of nitrogen was added 77.0 mL (894 mmol) of a 35% aqueous hydrogen peroxide solution at a rate slow enough to keep the internal temperature below 3°C. Next, 395 mL (395 mmol) of a 1.0 M aqueous lithium hydroxide solution was added at a rate slow enough to keep the internal temperature of the reaction below 5°C and the resulting mixture was stirred for 3 h at 0°C. The reaction was quenched with 755 mL (984 mmol) of a 1.3 M aqueous sodium sulfite solution at a rate slow enough to keep the internal temperature of the mixture below 5°C. All volatiles were removed *in vacuo* and the remaining aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 200 mL). The aqueous phase was then cooled to 0°C and acidified with a 6 M aqueous hydrogen chloride solution until a pH of 3 was achieved. The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 x 300 mL) and the combined organics were washed with brine (100 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography eluting with a 5-10 % ethyl acetate and 3% acetic acid in hexanes gradient to afford the title compound as a colorless gum (32.0 g, 82.0%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.39-7.28 (m, 5H), 4.85 (d, *J* = 8.2, 1H); 3.03-2.97 (m, 1H), 2.29-2.15 (m, 2H), 1.97 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 1.93-1.82 (m, 1H), 1.62-1.55 (m, 1H). LC-MS: *m/z* (ES) 201.0 (MH-H₂O)⁺.

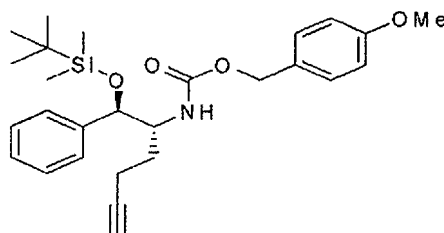
Step D: (2*R*)-2-[(*S*)-{[*Tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]hex-5-ynoic acid



To a stirred solution of 32.0 g (147 mmol) of (2*R*)-2-[(*S*)-hydroxy(phenyl)methyl]hex-5-ynoic acid from Step C above in 500 mL of anhydrous acetonitrile at ambient temperature under an atmosphere of nitrogen was added 77.0 mL (513 mmol) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene 22 mL followed by 66.3 g (440 mmol) of *tert*-butyldimethylsilyl chloride in three portions over 10 min. The reaction mixture was stirred for 4 h then evaporated *in vacuo* to remove all volatiles. The residue was diluted with 300 mL of dichloromethane and 100 mL of water. A 1.0 M aqueous hydrogen chloride solution was added to the mixture until a pH of 3 was achieved in the aqueous layer. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 x 100 mL). The combined organics were washed with water (50 mL), brine (50 mL) then dried over magnesium sulfate. After filtration and evaporation *in vacuo* the residue was dissolved in 350 mL of methanol and 350 mL (280 mmol) of a 0.8 M aqueous potassium carbonate solution was added. The resulting mixture was stirred for 1.5 h then evaporated *in vacuo* to remove all volatiles. The residue was diluted

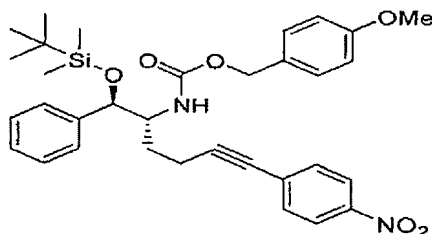
with 300 mL of dichloromethane and the aqueous phase was acidified with a 5.0 M aqueous hydrogen chloride solution until a pH of 3 was achieved. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 x 100 mL). The combined organics were washed with water (50 mL), brine (50 mL) then dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel chromatography eluting with a 3-15% ethyl acetate in hexanes gradient to afford the title compound as a colorless solid (42.3 g, 86.6%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.27 (m, 5H), 4.78 (d, *J* = 8.7, 1H), 2.90-2.86 (m, 1H), 2.19-2.11 (m, 1H), 2.10-2.03 (m, 1H), 1.90 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.75-1.67 (m, 1H), 1.41-1.34 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), -0.27 (s, 3H). LC-MS: *m/z* (ES) 333.2 (MH)⁺.

Step E: 4-Methoxybenzyl {(1*R*)-1-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pent-4-yn-1-yl}carbamate



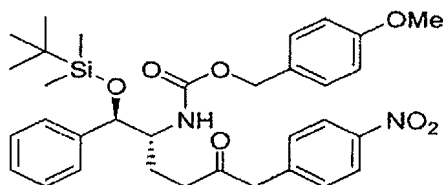
To a solution of 40.0 g (120 mmol) of (2*R*)-2-[(*S*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]hex-5-ynoic acid from Step D above and 33.5 mL (241 mmol) of triethylamine in 400 mL of anhydrous toluene at ambient temperature under an atmosphere of nitrogen was added 37.5 mL (132 mmol) of diphenylphosphoryl azide. The mixture was stirred for 5 h and then 37.5 mL (301 mmol) of 4-methoxybenzyl alcohol was added. The resulting mixture was heated to 105°C for 16 h, cooled to ambient temperature and then diluted with 250 mL of a saturated aqueous bicarbonate solution. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (2 x 150 mL). The combined organics were washed with water (100 mL), brine (100 mL) then dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography eluting with 3-10% ethyl acetate in hexanes to afford the title compound as a colorless oil (50.9 g, 90.5%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.28-7.21 (m, 7H), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.77-4.59 (m, 2H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.30-2.22 (m, 2H), 1.95 (m, 1H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.57-1.50 (m, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), -0.15 (s, 3H). LC-MS: *m/z* (ES) 468.1 (MH)⁺, 490.0 (MNa)⁺.

Step F: 4-methoxybenzyl [(1*R*)-1-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrophenyl)pent-4-yn-1-yl]carbamate



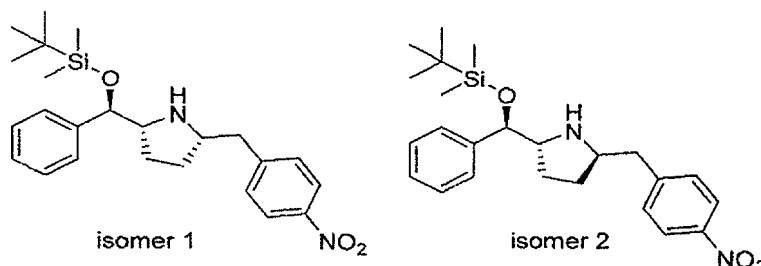
To a solution of acetylene (from Step E, 40g, 80 mmol) and 4-iodonitrobenzene (21.8 g, 88 mmol) in anhydrous DMF (500 ml) was added triethylamine (111 mL, 797 mmol). Pd(dppf)Cl₂ (1.95 g, 2.39 mmol) and copper(I) iodide (910 mg, 4.78 mmol) was added and the mixture degassed with nitrogen (bubble 15 min) and the resulting solution stirred at room temperature for 5 h. The mixture was poured into water (1200 m) and extracted with EtOAc (3 x 300 mL). The combined organics were then washed with water (2 x 500 mL), sat. NaCl (200 mL), dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated under vacuum. Residue was purified by MPLC (Horizon Biotage 2x Flash 65i) eluting with a gradient of 0-30% ethyl acetate in hexane to give 41g (84%) as a dark red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.11-8.04 (m, 2H), 7.94-8.01 (m, 1H), 7.38-7.21 (m, 8H), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.77-4.59 (m, 2H), 4.00-3.95 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 7.1 Hz, H = 2H), 2.00-1.95 (m, 1H), 1.66-1.61 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), -0.10 (s, 3H). LC-MS: *m/z* (ES) 589.3 (MH)⁺, 611.2 (MNa)⁺.

Step G: 4-methoxybenzyl [(1*R*)-1-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrophenyl)-4-oxopentyl]carbamate



To a solution of nitrophenyl acetylene (from Step F, 41 g, 65.5 mmol) in DMF (40 ml) was added pyrrolidine (14 mL, 196.5 mmol) and the resulting mixture heated at 80°C for 3 h. The mixture was cooled to room temperature and a 10% solution of acetic acid in water (110 ml) was added, and the resulting solution stirred at room temperature for another 3 h. The mixture was poured into water (300ml) and extracted with EtOAc (3 x 250 ml); combined EtOAc layers were washed with water (2 x 250ml), sat. NaCl (100ml), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by Horizon Flash 75 eluting with a gradient rising from 100% Hexanes to 50% EtOAc in Hexanes to give 34 g (81%) as a dark orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 8.17-8.14 (m, 2H), 7.32-7.23 (m, 9H), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.96 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 3Hz, 1H), 4.16-4.13 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.71-3.77 (m, 2H), 2.65-2.52 (m, 2H), 1.97-1.92 (m, 1H), 1.72-1.60 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.05 (s, 3H), -0.13 (s, 3H).

Step H: (2R, 5S)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine
(2R, 5R)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine

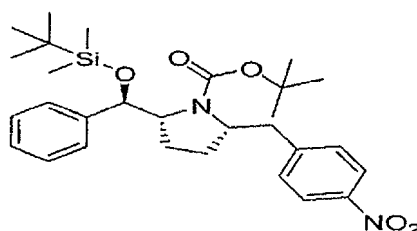


To a solution of MOZ protected ketone amine (from Step G, 34 g, 56 mmol) in DCM (350ml) was added TFA (256ml) and the resulting mixture stirred at room temperature for 1.5 h. The solution was evaporated under vacuum and residue partitioned between DCM and sat. NaHCO₃. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was dissolved in MeOH (750 ml) and cooled to 0°C via ice/water bath. Sodium cyanoborohydride (21.2 g, 337 mmol) was then added and the resulting mixture was stirred overnight to allow to warm to room temperature. The mixture was quenched by addition of water and the organics removed under vacuum. The aqueous layer was then extracted with EtOAc (x2) and the combined EtOAc layers washed with sat. NaCl, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica (eluent: gradient rising from 100% Hexanes to 35% EtOAc in Hexanes) to give 16.4 g (63.4%) of the first isomer, (2R, 5S)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine, and 3.1 g (12%) of the second isomer (2R, 5R)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine.

Isomer 1: LC-MS: m/z (ES) 427.3 (MH)⁺

Isomer 2: LC-MS: m/z (ES) 427.3 (MH)⁺

Step I: Tert-butyl (2R, 5S)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate

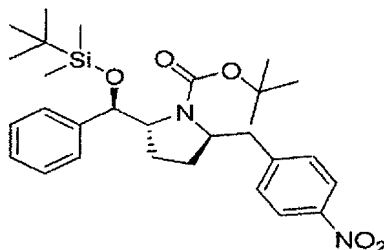


To a solution of *tert*-butyl (2R, 5S)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate (12 g, 42.5 mmol) in anhydrous THF was added Boc anhydride (9.3 g, 42.5 mmol) followed by TEA (17.76 mL, 127.4 mmol) and the resulting solution stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 2 h. The mixture was washed with water (100 mL) and extracted with ethyl

acetate (2 x 200 mL). The organics were dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated under vacuum. The residue was purified via Horizon Biotage MPLC (65i silica gel column) eluting with a gradient of 20-75% ethyl acetate in hexane to afford the desired product. LC-MS: m/z (ES) 527.3 (MH)⁺, 549.2 (MNa)⁺.

5

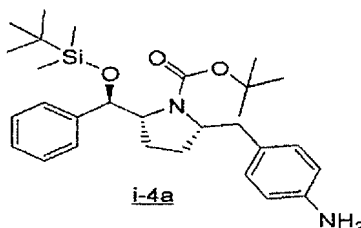
Step J: *Tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate



Prepared in the same manner as Step I but replacing the *cis* pyrrolidine isomer with the *trans* isomer, (2*R*, 5*R*)-2-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(nitrobenzyl)pyrrolidine. LC-MS: m/z (ES) 527.3 (MH)⁺, 549.2 (MNa)⁺.

10

Step K: *Tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4a);



15

A 500 mL parr shaker flask was charged with 10% Pd/c (4.75 g) and to this was added 100 mL of methanol to cover the catalyst. A solution of the nitro intermediate from Step I (8.5 g, 18.5 mmol) in methanol (80 mL) was then added to the suspension, followed by 15.4 mL of 1.0 M hydrogen chloride in methanol solution. The reaction vessel was set under 50 PSI hydrogen gas and the mixture aggitated overnight. An aliquot was taken and analyzed through the LC-MS which showed complete reaction.

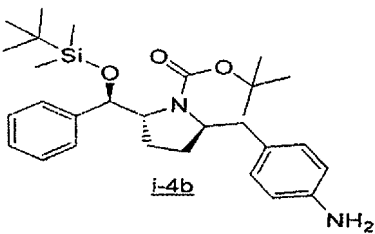
20

The catalyst was filtered off using celite and washed with methanol (2 x 100 mL). The filtrate was concentrated to dryness and the product was purified via Horizon MPLC (65i silica column) eluting with a gradient rising from 0% to 30% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (6.2g, 72%). m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.38-7.29 (m, 5H), 6.76-6.68 (m, 2H), 6.55-6.50 (m, 2H), 5.52-5.49 (m, 1H), 5.30-5.27 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 2H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.76-3.71 (m, 1H), 3.55-3.47 (m, 2H), 2.74 (br d, J = 11.7 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 11.7 Hz, 1H), 2.05-1.93 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 1H), 1.60 (s, 9H).

25

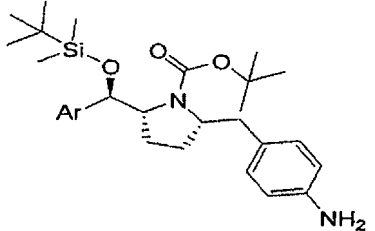
1.50-1.42 (m, 1H), 1.31-1.21 (m, 2H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.92 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 0.13 (br d, J = 14.0 Hz, 3H), -0.05 (s, 3H)

Step L: Tert-butyl (2R, 5R)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4b)



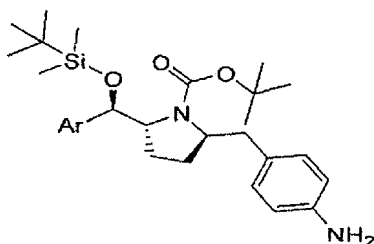
Prepared in the same manner as Step K but replacing the cis pyrrolidine isomer with the trans isomer, *Tert-butyl (2R, 5R)-2-[(R)-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate*. *m/z* (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.41-7.30 (m, 5H), 6.73-6.67 (m, 2H), 6.56-6.50 (m, 2H), 5.52-5.48 (m, 1H), 5.33-5.28 (m, 1H), 4.15-4.06 (m, 2H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.59-3.46 (m, 2H), 2.72 (br d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 12.0 Hz, 1H), 2.05-1.93 (m, 1H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.49-1.42 (m, 1H), 1.32-1.20 (m, 2H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.14 (br d, J = 13.7 Hz, 3H), 0.10 (s, 3H).

The following intermediates were prepared from the appropriate starting materials using the procedures described above for intermediate i-4a.



Intermediate	Ar	Calc. Mass	MS (e/z) (MH) ⁺
i-4c		514.30	515.30
i-4d		514.30	515.30
i-4e		532.30	533.30
i-4f		532.30	533.30

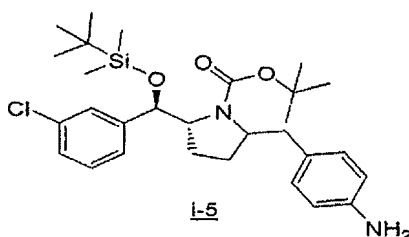
The following intermediates were prepared from the appropriate starting materials using the procedures described above for intermediate i-4b.



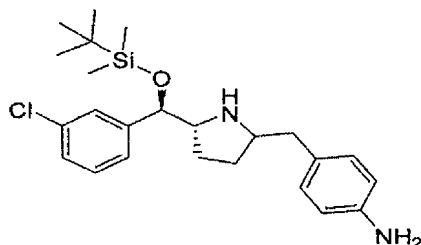
Intermediate	Ar	Calc. Mass	MS (e/z) (MH) ⁺
i-4g		514.30	515.30
i-4h		514.30	515.30

INTERMEDIATE 5

5 Tert-butyl(5R)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(R)-{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}(3-chlorophenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-5)



Step A: 4-({(5R)-5-[(R)-{tert-butyl(dimethyl)silyl}oxy}(3-chlorophenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl)aniline



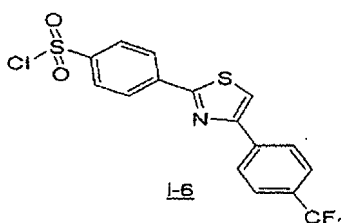
To a solution of 100 mg (0.15 mmol) of benzyl{4-[(3E, 5R, 6R)-5-
 {[(benzyloxy)carbonyl]amino-6-{tert-butyl (dimethyl)silyl}oxy}-6-(3-chlorophenyl)-2-oxohex-
 3-en-1-yl]phenyl}carbamate (from Step A, i-3) in 8 mL ethyl acetate was added 10% palladium
 on carbon and the suspension was set under hydrogen atmosphere via a balloon of hydrogen gas.
 The reaction was stirred under hydrogen for 8 h at room temperature. The catalyst was filtered
 off using a Gilmen 0.45 μM PTFE syringe filter and washed with ethyl acetate (4 x 2 mL). The
 filtrate was concentrated to dryness under vacuum and the residue purified by preparative plate
 (1000 μM) eluting with 5% methanol in dichloromethane to afford the title compound (33 mg,
 51%). *m/z* (ES) 430, 432 (M, M+2)⁺.

Step B: *Tert*-butyl(5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]pyrrolidine-carboxylate (i-5)

To a solution of 33 mg (0.07 mmol) of 4-({(5*R*)-5-[(*R*)-([*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(3-chlorophenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl)aniline in 1 mL of anhydrous THF (from Step A) was added *tert*-butyl carbonate (15.3 mg, 0.07 mmol), followed by TEA (13 μ L, 0.07 mmol) and the resulting solution stirred at room temperature under nitrogen atmosphere overnight. The reaction mixture was put directly on a preparative plate (500 μ M) and eluted with 30% ethyl acetate in hexane to afford the title compound (25 mg, 78%). *m/z* (ES) 530, 532 (M, M+2)⁺, 430, 432 (M-Boc, M-Boc+2)⁺.

INTERMEDIATE 6

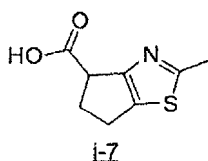
4-{4-[4-(Trifluoromethyl)phenyl]-1,3-thiazol-2-yl}benzenesulfonyl chloride (i-6)



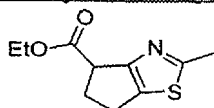
Intermediate 6 can be prepared according to published procedures, for example, Ikemoto et al., *Tetrahedron* 2003, 59, 1317-1325.

INTERMEDIATE 7

2-Methyl-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-7)



Step A: Ethyl 2-methyl-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate



To a solution of ethyl 2-oxocyclopentane-2-carboxylate (56 g, 359 mmol) in chloroform (500 mL) cooled at 0°C was added bromine (18.5 mL, 359 mmol) over ~20 min. After complete addition mixture allowed to warm to room temperature and stirred overnight. Nitrogen gas bubbled through mixture for 90 min to remove most of HBr. Washed with water (500 mL), sat. NaHCO₃ (250 mL), sat. NaCl (200 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Residue dissolved in EtOH (500 mL) and thioacetamide (26.9 g, 359 mmol) added, mixture stirred at room temperature for 1 h then at reflux overnight. The mixture was cooled and

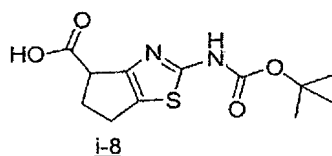
evaporated, and the residue partitioned between DCM and sat. NaHCO₃, organic layer washed with sat. NaCl, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The Residue purified by MPLC (Biotage Horizon: 2 x FLASH 65i) eluent: 100% Hexanes (450 mL), gradient rising from 100% Hexanes to 25% EtOAc in Hexanes (1400 mL), then 25% EtOAc in Hexanes to give the title compound (32 g, 42%) as a dark oil. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.22 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.96 (m, 1H), 3.04 (m, 1H), 2.88 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 1.30 (t, J = 7.0Hz, 3H).

Step B: 2-Methyl-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-7)

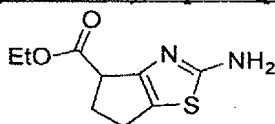
To a solution of 31.5 g (149 mmol) of ethyl 2-methyl-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate in THF (450 mL) and methanol (100 mL) (from step A) was added a solution of lithium hydroxide (149 mL of a 1M solution, 149 mmol) and the resulting mixture stirred at room temperature for 3 h. Organics removed by evaporation and aqueous residue extracted with Et₂O (2 x 250 mL) and acidified to pH 3 by the addition of 1 M HCl (~170 mL) and saturated with solid NaCl. Extracted with DCM (3 x 250 mL), combined DCM layers dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Extracted with DCM (3 x 250 mL), combined DCM layers dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Residue triturated with acetonitrile, filtered and dried to give the title compound (7.1 g, 26%) as an off white solid. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 11.75 (br s, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.00 (m, 1H), 2.90-2.66 (m, 6H).

INTERMEDIATE 8

2-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-8)

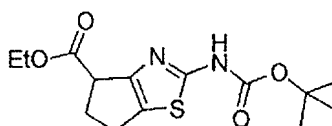


Step A: Ethyl 2-amino-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate



Prepared in the same manner as intermediate (i-7) replacing the thioacetamide in Step A with thiourea. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 5.30 (br s, 2H), 4.21 (q, J = 7.0, 2H), 3.81 (m, 1H), 2.91 (m, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 1.30 (t, J = 7.0, 3H).

Step B: Ethyl 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate



To a solution of 230 mg (1.08 mmol) of ethyl 2-amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate in dichloromethane (5 mL) (from step A) was added di-*tert* butyldicarbonate (236 mg, 1.08 mmol), triethylamine (0.15 mL, 1.08 mmol) and DMAP (13 mg, 0.11 mmol) and the resulting mixture stirred at room temperature for 2 h. Mixture washed with 1N HCl (10 mL), sat. NaCl (5 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated.

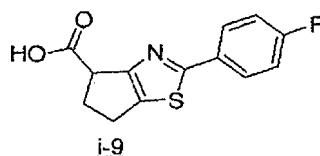
Residue purified by MPLC (Biotage Horizon: FLASH 25+S) eluent: 100% Hexanes (100 mL), gradient 0-15% EtOAc in Hexanes (900 mL) then 15% EtOAc in Hexanes (500 mL) to give the title compound (160 mg, 47%) as a white foam. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 9.23 (br s, 1H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.95 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.04 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 1.55 (s, 9H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Step C: 2-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-8)

Prepared from ethyl 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylate (from step B) using a procedure analogous to that found in intermediate (i-7) step B. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 3.96 (m, 1H), 3.06 (m, 1H), 2.88 (m, 2H), 2.71 (m, 1H), 1.55 (s, 9H).

INTERMEDIATE 9

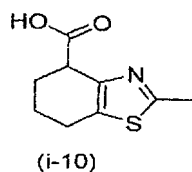
2-(4-Fluorophenyl)-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-9)



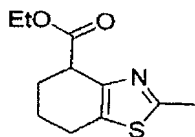
Prepared using procedures analogous to those found in intermediate 7 (i-7) replacing thioacetamide with 4-fluorothiobenzamide in step A. ¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.90 (m, 2H), 7.29 (t, *J* = 8.7, 2H), 3.81 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.86 (m, 1H), 2.70-2.58 (m, 2H).

INTERMEDIATE 10

2-Methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylic acid (i-10)



Step A: Ethyl 2-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylate



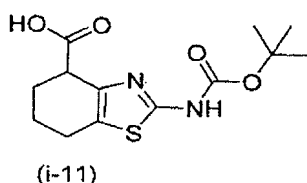
To a solution of ethyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (15 g, 88 mmol) in anhydrous diethyl ether (40 mL) cooled at 0°C was added bromine (4.5 mL, 88 mmol) dropwise over 15 mins. After complete addition mixture allowed to warm to room temp over 90 min. Mixture diluted with EtOAc (100 mL) and washed with sat. NaHCO₃, sat. NaCl, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Residue taken up in ethanol (100 mL) and thioacetamide (6.6 g, 88 mmol) added. Mixture stirred at room temp for 1 h then at reflux overnight. Mixture evaporated and residue partitioned between sat. NaHCO₃ and DCM. Organic layer dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Residue purified by MPLC (Biotage Horizon: FLASH 65i) eluent: 100% Hexanes (500 mL), gradient 0 to 25% EtOAc in Hexanes (1200 mL) then 25% EtOAc in Hexanes (1200 mL) to give the title compound (6.14 g, 31%) as a pale orange oil. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 4.22 (q, J = 7.1, 2H), 3.84 (t, J = 5.5, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.65 (s, 3H), 2.18 (m, 1H), 2.11-1.95 (m, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.29 (t, J = 7.1, 3H).

Step B: 2-Methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylic acid (i-10)

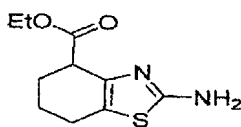
Prepared from ethyl 2-methyl-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylate (from step A) according to the procedure outlined in intermediate (i-7) step B. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.26 (br s, 1H), 3.81 (q, J = 7.3 and 5.9, 1H), 2.75 (m, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.24 (m, 1H), 2.18-2.01 (m, 2H), 1.82 (m, 1H).

INTERMEDIATE 11

2-[(Tert-butoxycarbonyl)amino]-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylic acid (i-11)



Step A: Ethyl 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylate



Prepared according to the procedures outlined in intermediate 10 (i-10) step A replacing thioacetamide with thiourea. ¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.28 (br s, 2H), 4.11 (q, J = 7.3, 2H), 3.71 (t, J = 5.0, 1H), 2.57-2.39 (m, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.17 (t, J = 7.3, 3H).

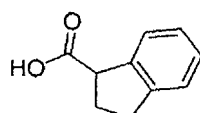
Step B: 2-[(*Tert*-butoxycarbonyl)amino]-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylic acid (i-11)

Prepared from ethyl 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzothiazole-4-carboxylate (from step A) according to the procedures outlined in intermediate 8 (i-8) steps B and C.

5 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 3.70 (t, $J = 5.2$, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.10-1.94 (m, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.55 (s, 9H).

INTERMEDIATE 12

Indan-1-carboxylic acid (i-12)



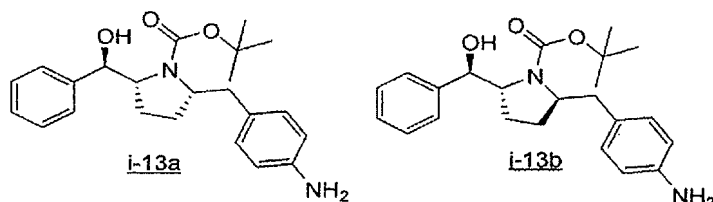
10

Prepared according to the literature procedure Journal of Organic Chemistry (2000), 65(4), 1132-1138.

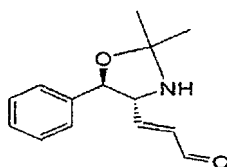
INTERMEDIATE 13a AND INTERMEDIATE 13b

15 *Tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-13a);

Tert-butyl (2*R*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-13b)



20 Step A: *Tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2, 2-dimethyl-4-[(1*E*)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-5-phenyl-1, 3-oxazolidine-3-carboxylate

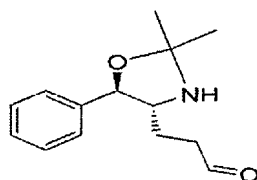


To a solution of *tert*-butyl (4*S*, 5*R*)-4-formyl-2, 2-dimethyl-5-phenyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (20.9, 89.1 mmol) in CH_2Cl_2 (150 mL) was added

25 (triphenylphosphoranylidene) acetaldehyde (27.1 g, 89.1 mmol) and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 40 h. After removal of 1/3 of the solvent, hexanes was generously added and the resulting solid was filtered off. Flash chromatography on a Biotage Horizon® system (silica gel, 0 to 20% ethyl acetate in hexanes gradient then 20% ethyl acetate in hexanes) gave 16.3 g (72%) of the title compound as a yellow oil. LC/MS 354.3 ($M+23$).

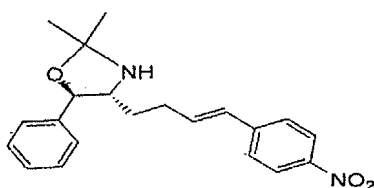
30

Step B: *Tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2, 2-dimethyl-4-(3-oxopropyl)-5-phenyl-1, 3-oxazolidine-3-carboxylate



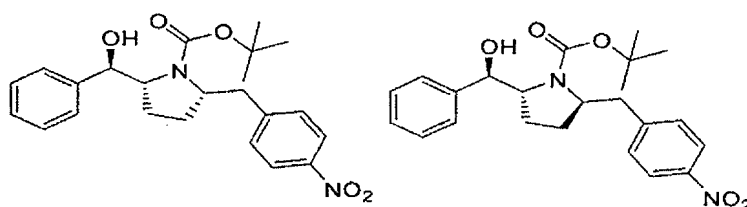
To a solution of *tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2,2-dimethyl-4-[(1*E*)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-5-phenyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (19.6 g, 59.1 mmol) (from Step A) in acetone (150 mL) was added 1.9 g of 10% Pd/C and the resulting suspension was stirred under a hydrogen balloon at ambient temperature for 24 h. The solid was filtered off on celite and the filtrate concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography on a Biotage Horizon® system (silica gel, 0 to 20% ethyl acetate in hexanes gradient then 20% ethyl acetate in hexanes) to afford 11.5 g (58%) of the title compound as a colorless oil. LC/MS 356.3 (M+23).

Step C: *Tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2, 2-dimethyl-4-[(3*E*)-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-1-yl]-5-phenyl-1, 3-oxazolidine-3-carboxylate and *tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2, 2-dimethyl-4-[(3*Z*)-4-(4-nitrophenyl)but-3-en-1-yl]-5-phenyl-1, 3-oxazolidine-3-carboxylate



To a solution of *tert*-butyl (4*R*, 5*R*)-2, 2-dimethyl-4-(3-oxopropyl)-5-phenyl-1, 3-oxazolidine-3-carboxylate (10.0 g, 30.0 mmol) from Step B in CH₂Cl₂ (200 mL) was added (4-nitrobenzyl)triphenyl-phosphonium bromide (21.5g, 45.0 mmol) followed by Et₃N (8.36 mL, 60.0 mmol). The red reaction mixture was stirred at ambient temperature for 48 h. Hexane (200 mL) was poured into the reaction mixture and the solid was filtered off. Flash chromatography on a Biotage Horizon® system (silica gel, 0 to 10% ethyl acetate in hexanes gradient then 10% ethyl acetate in hexanes) afforded 10.7 g (79%) of the title compounds (*cis trans* mixture) as pale yellow foam. LC/MS 475.4 (M+23).

Step D: *Tert*-butyl (2*R*, 5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate and *tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate



To a solution of the above *cis/trans* mixture (7.86 g, 17.4 mmol) from Step C in ethyl acetate (100 mL) was added 50 mL of 2N HCl solution and the resulting mixture was stirred at ambient temperature for 2 h then heated to 45°C for 3 h. The volatiles were removed under reduced pressure. The resulting white solid was dissolved in *N,N*-dimethylformamide (100 mL) and 15.1 mL (86.7 mmol) of ^tPr₂Net was added. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 7 h. Di-*tert*-butyl dicarbonate (4.55 g, 20.8 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature overnight. Water (200 mL) was added and it was extracted with ethyl acetate (200 mL x 3). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on a Biotage Horizon® system (silica gel, 0 to 30% ethyl acetate in hexanes gradient) to afford 1.61 g (22%) of the title compounds *tert*-butyl (2*R*, 5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate (*cis*) and 3.9 g (54%) of *tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate (*trans*). LC/MS 435.4 (M+23).

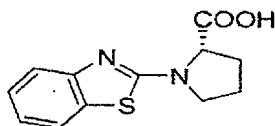
Step E: *Tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-13a)

To a solution of the above (*cis*) *tert*-butyl (2*R*, 5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate (1.51 g, 3.66 mmol) from Step D in ethanol (20 mL) was added 0.15 g of 10% Pd/C and the resulting suspension was stirred under a hydrogen balloon at ambient temperature for 5 h. Filtration through celite and removal of the solvent gave 1.40 g (100%) of the title compound as white foam which was used without further purification. LC/MS 405.3 (M+23).

Step F: *Tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-13b)

To a solution of (*trans*) *tert*-butyl (2*R*, 5*R*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-(4-nitrobenzyl)pyrrolidine-1-carboxylate (3.90 g, 9.46 mmol) from Step D in ethanol (40 mL) was added 0.4 g of 10% Pd/C and the resulting suspension was stirred under a hydrogen balloon at ambient temperature for 6 h. The solid was filtered off through celite. After removal of the solvent, flash chromatography on a Biotage Horizon® system (silica gel, 0 to 30% ethyl acetate in hexanes gradient then 30% ethyl acetate in hexanes) afforded 2.30 g (64%) of the title compound as a white foam. LC/MS 405.3 (M+23).

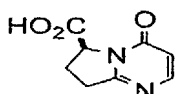
INTERMEDIATE 14
(2*S*)-1-(1,3-benzothiazol-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (i-14):



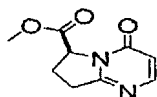
To a solution of 28 mg (0.24 mmol) of L-Proline in N, N-dimethylformamide (3 mL) at ambient temperature was added 51 mg (0.24 mmol) of 2-bromobenzothiazole, 100 mg (0.72 mmol) of potassium carbonate, and 6 mg (0.03 mmol) of copper iodide. The reaction mixture was stirred at 100°C overnight. It was then filtered and purified by reverse-phase HPLC (TMC Pro-Pac C18; 0-60% 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid in water gradient). The pure fractions were lyophilized overnight to give 35 mg 60% of the title compound as a light brown solid. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.08 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 4.48 (d, J = 7.3 Hz, 1 H), 3.52-3.61 (m, 2 H), 2.37 (m, 1 H), 2.01-2.11 (m, 3 H). LC/MS 249.3 (M+1)

INTERMEDIATE 44

Preparation of [(6S)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-]pyrimidine-6-carboxylic acid (i-44)

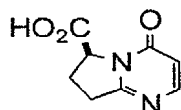


Step A: Methyl [(6S)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-]pyrimidine-6-carboxylate



Methyl (2S)-5-methoxy-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylate (4.19 g, 26.6 mmol) and 3-azatricyclo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-en-4-one (2.4 g, 17.8 mmol) was heated at 110°C overnight. Purification using a Biotage Horizon® system (0-100% ethyl acetate/hexanes mixture) gave the title compound methyl [(6S)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-^α]pyrimidine-6-carboxylate and intermediate methyl (7S)-9-oxo-3,8-diazatetracyclo[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}]tetradeca-3,12-diene-7-carboxylate. The intermediate was heated at 150°C for 45 min to afford the title compound without further purification. LC/MS 195.2 (M+1).

Step B: [(6S)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-]pyrimidine-6-carboxylic acid

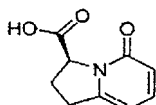


Methyl [(6S)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-^α]pyrimidine-6-carboxylate (9.95 g, 51.2 mmol) in tetrahydrofuran (60 mL), methanol (40 mL) and a solution of lithium hydroxide (3.32g, 77 mmol) in water (40 mL) was stirred at ambient temperature for 1 h. 2 N hydrochloric acid (38.5 mL) was added to neutralize the reaction mixture which was then directly purified by reverse phase HPLC (TMC Pro-Pac C18; 0-40% 0.1% trifluoroacetic acid in

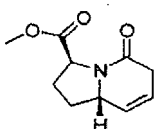
acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid in water gradient). The O-alkylation product was eluted fast. The pure fractions were collected and lyophilized overnight to afford the title compound as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 7.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 10.0, 3.1 Hz, 1H), 3.12-2.99 (m, 2H), 2.52 (m, 1H), 2.11 (m, 1H). LC/MS 181.2 (M+1).

INTERMEDIATE 46

(3*S*)-5-Oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxylic acid (i-46)

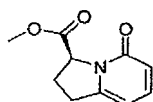


Step A: (3*S*,9*S*)-5-Oxo-1,2,3,5,6,8a-hexahydroindolizine-3-carboxylic acid methyl ester



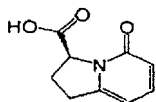
This intermediate was prepared according to the procedures found in: Hanessian, S.; Sailes, H.; Munro, A.; Therrien, E. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 7219 and Vaswani, R. G.; Chamberlin, R. *J. Org. Chem.* 2008, 73, 1661.

Step B: Methyl (3*S*)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxylate



To a stirred solution of 0.850 g (4.06 mmol) of (3*S*,9*S*)-5-oxo-1,2,3,5,6,8a-hexahydroindolizine-3-carboxylic acid methyl ester from step A above in 50 mL of dichloromethane was added 6.30 g (72.5 mmol) of manganese(IV) oxide and the resulting mixture was stirred for 12 h at reflux. The reaction was cooled to ambient temperature, filtered through a pad of Celite®, and the solid was then washed with 100 mL of dichloromethane. The filtrate was evaporated to dryness *in vacuo* and the residue was purified by silica gel chromatography eluting with 10-50% ethyl acetate in hexanes gradient to afford the title compound as a clear gum (0.47 g, 55 % yield). LC-MS: *m/z* (ES) 194 (MH)⁺.

Step C: (3*S*)-5-Oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxylic acid

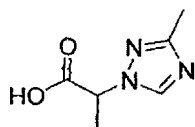


To a stirred solution of 0.200 mg (1.00 mmol) of methyl (3*S*)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxylate from step B above in 3 mL of THF was added 1.5 mL (1.5 mmol) of a 1.0 M aqueous LiOH solution. The resulting mixture was stirred for 2 h at ambient

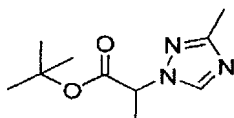
temperature then quenched with 2.0 mL (2.0 mmol) of a 1.0 M aqueous solution of hydrogen chloride. All volatiles were evaporated *in vacuo* and the aqueous phase was extracted with a 30% IPA in chloroform mixture (3 x 5 mL). The combined extract were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered, and evaporated *in vacuo* to afford the title compound as a white solid (0.17 g, 92%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.53 (dd, *J* = 8.9, 7.1 Hz, 1H), 6.38-6.35 (m, 2H), 5.11 (dd, *J* = 9.7, 2.7 Hz, 1H), 3.23-3.12 (m, 2H), 2.62-2.53 (m, 1H), 2.35-2.30 (m, 1H). LC-MS: *m/z* (ES) 180 (MH)⁺.

INTERMEDIATE 56

2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoic acid (i-56)

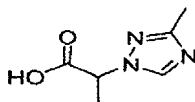


Step A: Tert-butyl 2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoate



To a solution of 3-methyl-1H-1,2,4-triazole (7.3 g, 88 mmol) in DMF (75 mL) was added K₂CO₃ (60.7 g, 439 mmol) and 2-bromopropionic acid *tert*-butyl ester (14.6 mL, 88 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. The mixture was diluted with EtOAc (500 mL), washed with water (x 3) then brine. Dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel, eluting with EtOAc/isohexane (20 to 100%) to give 13 g of crude product as a 3:1 mixture of regioisomers. The mixture was purified by Chiralcel OD with a gradient from 4% to 30% IPA/Heptane. Then the first two peaks were separated with Chiralcel OD column isocratically eluting with 4% IPA/Heptane. The second peak was collected as the desired single stereoisomer (R or S) (2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoic acid *tert*-butyl ester) (3.5 g, 19%). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (s, 1 H), 4.90 (q, *J* = 7 Hz, 1 H), 2.35 (s, 3 H), 1.72 (d, *J* = 7 Hz, 3 H), 1.40 (s, 9 H). ESI-MS calculated for C₁₀H₁₇N₃O₂: Exact Mass: 211.13; Found 156.05 (-tBu).

Step B: 2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoic acid

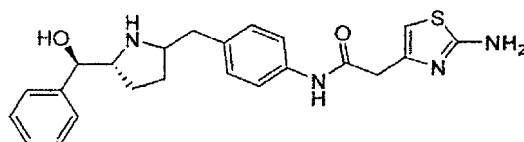


Tert-butyl 2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoate (1.0 g, 4.7 mmol) was dissolved in 4 M HCl in dioxane (100 mL) and stirred at room temperature overnight. The product was concentrated under reduced pressure and dried under high vacuum to give (R or S)

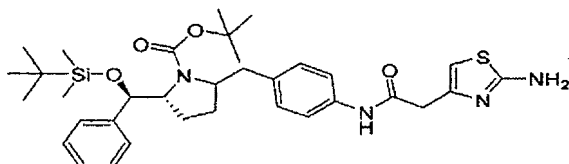
tert-butyl 2-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)propanoate as the HCl salt (850 mg). ESI-MS calculated for C₆H₉N₃O₂: Exact Mass: 155.07; Found 156.05.

Compound 1

5 2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[4-({(5R)-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidinyl)methyl}phenyl]acetamide



Step A: *Tert*-butyl (5R)-2-(4-{{(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetyl}amion}benzyl)-5-[(R)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate

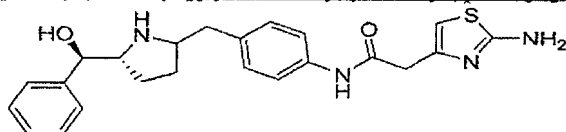


10

To a solution of 10 mg (5:1 mixture cis/trans, 0.02 mmol) of *tert*-butyl(5R)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(R)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-3) and (2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetic acid (3.18 mg, 0.02 mmol) in 0.5 mL anhydrous DMF was added a 0.5 M solution of HOAt in DMF (0.04 mL, 0.02 mmol) followed by EDC (5.8 mg, 0.03 mmol) and DIEA (3.5 μ L, 0.02 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 16 h. The mixture was washed with water and extracted with dichloromethane (2 x 2 mL). The organics were combined, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by preparative TLC plate (500 μ M) eluting with 5% MeOH in dichloromethane to afford the product (10.3 mg, 81%). *m/z* (ES) 637 (MH)⁺, 659 (MNa)⁺.

20

Step B: 2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[4-({(5R)-[(R)hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidinyl)methyl}phenyl]acetamide



25

To a solution of 7 mg (0.01 mmol) of *tert*-butyl (5R)-2-(4-{{(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetyl}amion}benzyl)-5-[(R)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate in 0.20 mL methanol (from Step A) was added 0.20 mL conc. HCl and the reaction mixture stirred at room temperature for 1 h. Azeotrop with toluene (2x) to remove water. The residue was taken up in acetonitrile/water/MeOH (9:1:1) and purified on the Gilson HPLC eluting with a 0-50% gradient of acetonitrile/water with 0.05% TFA buffer. The fractions containing the product were combined, frozen, and lyophilized to give a white foam (3.3 mg,

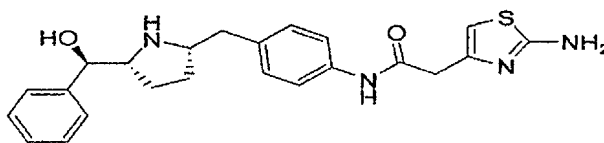
30

71%). m/z (ES) 423 (MH)⁺. (~5:1 mixture) ¹HNMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.56 (br d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44 (d, 7.8 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 2H) 7.35-7.32 (m, 0.8H) 7.32-7.29 (m, 0.2H minor isomer), 7.26 (d, J = 8.0 Hz, 1.7H), 7.14 (d, J = 8.1 Hz, 0.3H minor isomer) 6.67 and 6.66 (br s, 0.2/0.8H, totaling 1H). 4.72 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.80-3.70 (m, 4H) 3.14 (dd, J = 6.1, 13.8 Hz, 1H), 2.95 (dd, J = 9.1, 13.8 Hz, 1H), 2.08-2.00 (m, 1H), 1.86-1.74 (m, 3H).

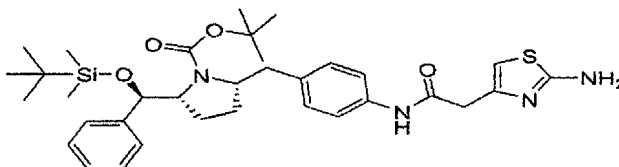
Using the Biological Assays described herein, the human β 3 functional activity of Compound 1 was determined to be between 1 to 10 nM.

Compound 2

2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[4-({(2*S*, 5*R*)-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidinyl)methyl}phenyl]acetamide

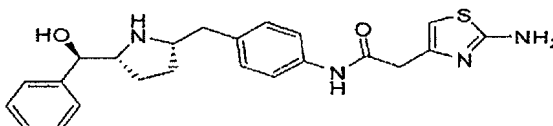


Step A: *Tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-{{(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetyl}amion}benzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate



The title compound was prepared from *tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (i-4a) and (2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetic acid according to the procedure of Compound 1, step A. The crude product was purified by preparative TLC plate eluting with 5% MeOH in dichloromethane to afford the product (4.1 mg, 21%). m/z (ES) 637 (MH)⁺, 659 (MNa)⁺.

Step B: 2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[4-({(2*S*, 5*R*)-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidinyl)methyl}phenyl]acetamide



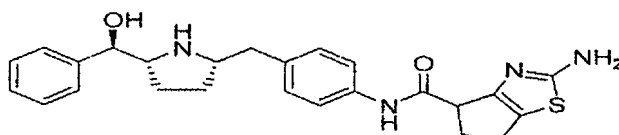
The title compound was prepared from 4 mg of *tert*-butyl (2*S*, 5*R*)-2-(4-{{(2-amino-1,3-thiazol-4-yl)acetyl}amion}benzyl)-5-[(*R*)-{[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (from Step A) according to the procedure of Compound 1, step B. The crude product was purified on the Gilson HPLC eluting with a 0-50% gradient of acetonitrile/water with 0.05% TFA buffer. The fractions containing the product were combined, frozen, and lyophilized to give a white foam (3.3 mg, 71%). m/z (ES) 423 (MH)⁺. ¹HNMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (br d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44

(d, 7.8 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 2H) 7.35-7.33 (m, 1H), 7.25 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.65 (br s, 1H). 4.72 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.80-3.72 (m, 4H) 3.14 (dd, J = 6.1, 13.8 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 9.1, 13.8 Hz, 1H), 2.07-2.00 (m, 1H), 1.85-1.73 (m, 3H).

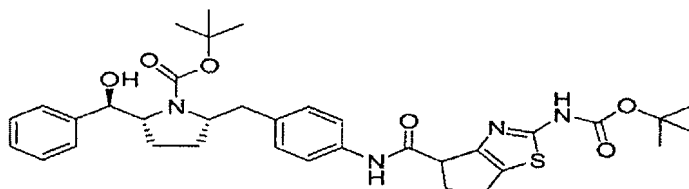
Using the Biological Assays described herein, the human $\beta 3$ functional activity of Compound 2 was determined to be between 1 to 10 nM.

Compound 3

2-Amino-N-[4-(((2S, 5R)-5-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl)phenyl]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxamide

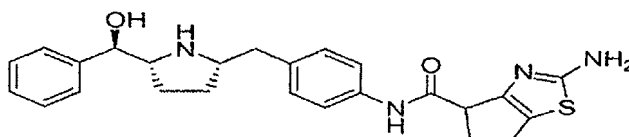


Step A: Tert-butyl-(2S, 5R)-2-(4((2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazol-4-yl)carbonyl)amino)benzyl)-5-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate



To a solution of 220 mg (0.58 mmol) of *tert*-butyl (2S, 5R)-2-(4-aminobenzyl)-5-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl] pyrrolidine-1-carboxylate (i-13a) and 164 mg (0.58 mmol) of 2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxylic acid (i-8) in anhydrous DMF (5 mL) was added EDC (165 mg, 0.86 mmol), HOBt (132 mg, 0.86 mmol) and Hunig's Base (0.3 mL, 1.7 mmol) and the resulting mixture stirred at room temperature overnight. Poured into water (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 30 mL), combined EtOAc layers washed with water (2 x 50 mL), sat. NaCl (25 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated. Residue purified by MPLC (Biotage Horizon: FLASH 25+M) eluent: 100% Hexanes (100 mL), gradient 0 to 35% EtOAc in Hexanes (750 mL), then 35% EtOAc in Hexanes (600 mL). Diastereoisomers separated by chiral HPLC on AD column (eluent: 25% IPA in Heptane) first eluting isomer (134 mg, 36%) second eluting isomer (126 mg, 34%) both as white foams.

Step B: 2-Amino-N-[4-(((2S, 5R)-5-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl)phenyl]-5,6-dihydro-4H-cyclopenta [α] [1,3] thiazole-4-carboxamide



To a solution of 126 mg (0.19 mmol) of *tert*-butyl-(2*S*, 5*R*)-2-(4[(2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta [α] [1,3] thiazol-4-yl}carbonyl)amino]benzyl}-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidine-1-carboxylate (from step A, second eluting isomer) in DCM (3 mL) was added trifluoroacetic acid (3.0 mL, 38mmol) the resulting mixture stirred at room temperature for 4 h. The mixture was evaporated and passed through an SCX cartridge eluting with 2 M NH₃ in methanol to free up the base. Product purified by PREP- TLC 2x [20 x 20cm x 1000micron] eluent: 15% MeOH in DCM + 1% NH₄OH and product lyophilized to give the title compound (65 mg, 75%) as a white fluffy solid. m/z (ES) 449 (MH)⁺. ¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.00 (s, 1H), 7.51 (d, J = 8.2, 2H), 7.30 (m, 4H), 7.21 (t, J = 6.9, 1H), 7.12 (d, J = 8.2, 2H), 6.86 (s, 1H), 4.23 (d, J = 7.3, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.21 (m, 1H), 3.10 (m, 1H) 2.78 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.49 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.39 (m, 2H).

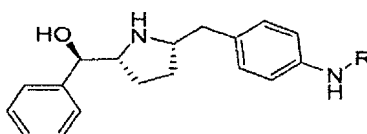
Product from Step A [first eluting isomer] (134 mg, 0.207 mmol) was deprotected in similar fashion to give the title compound (44 mg, 48%) as a white fluffy solid. m/z (ES) 449 (MH)⁺.

Using the Biological Assays described herein, the human β 3 functional activity of Compound 3 was determined to be less than 1 nM.

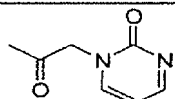
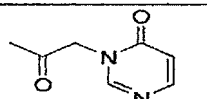
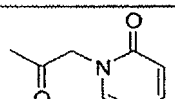
Compounds 4-10

Using procedures similar to those described above, Compounds 4-10 were prepared from the appropriate starting materials.

Using the Biological Assays described herein, the human β 3 functional activity of each compound was determined and shown in the following table.

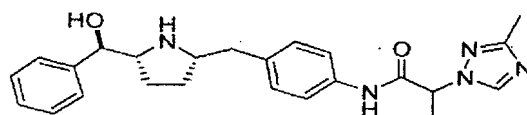


Compound Number	R	MW	MS (ES) (MH) ⁺	HUMAN β 3 BINDING
4		468.56	469.50	1 – 10 NM
5		418.49	419.24	1 – 10 NM
6		432.53	433.50	1 – 10 NM
7		468.56	469.52	1 – 10 NM

8		418.50	419.48	1 – 10 NM
9		418.50	419.48	1 – 10 NM
10		417.51	418.50	1 – 10 NM

Compound 11

N-(4-(((2*S*,5*R*)-5-((*R*)-hydroxy(phenyl)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phenyl)-2-(3-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propanamide

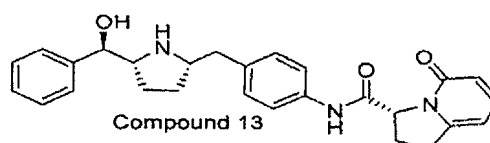
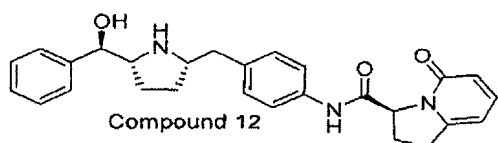


A mixture of i-13a (2.00 g, 5.23 mmol), 2-(3-methyl-1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propanoic acid i-56 (1.00 g, 5.23 mmol), HOAt (1.307 mL, 0.784 mmol), and EDC (2.005 g, 10.46 mmol) in DMF (20 mL) was stirred at room temperature for 10 min. The reaction mixture was quenched with aqueous sodium bicarbonate and extracted with EtOAc. The crude product was purified by column chromatography (0-3% MeOH (10% NH₄OH) in DCM. After evaporation, the product was further purified by chiral HPLC (AD column, 30% IPA/Heptanes) to give the pure boc protected intermediate, which was dissolved in a minimal volume of dioxane and 4 M HCl in dioxane was added. After 2 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure to give the HCl salt of the title compound. Basic reverse phase HPLC (0.1% NH₄OH in H₂O, MeCN) yielded the desired free base of the title compound. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.51 (s, 1 H), 7.49 (d, *J* = 13 Hz, 2 H) 7.35-7.29 (m, 4 H), 7.26-7.20 (m, 4 H), 5.20 (q, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 4.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 3.27-3.22 (m, 2 H), 2.80-2.72 (m, 2 H), 2.34 (s, 3 H), 1.82 (d, *J* = 7.5 Hz, 3 H), 1.79-1.73 (m, 1 H), 1.52-1.48 (m, 3 H). ESI-MS calculated for C₂₄H₂₉N₅O₂: Exact Mass: 419.23, found 420.35.

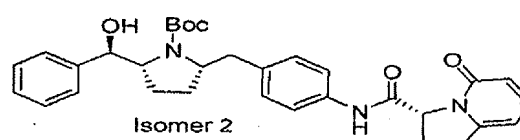
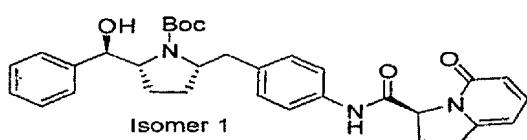
Using the Biological Assays described herein, the human β₃ functional activity of Compound 11 was determined to be between 1 to 10 nM.

Compounds 12 and 13

(3*S*)-*N*-[4-(((2*S*,5*R*)-5-((*R*)-hydroxy(phenyl)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phenyl]-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxamide (Compound 12) and (3*R*)-*N*-[4-(((2*S*,5*R*)-5-((*R*)-hydroxy(phenyl)methyl)pyrrolidin-2-yl)methyl)phenyl]-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxamide (Compound 13)

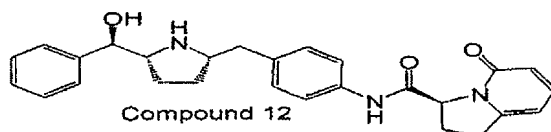


Step A: *Tert*-butyl (2*R*,5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-[4-({[(3*S*)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizin-3-yl]carbonyl}amino)benzyl]pyrrolidine-1-carboxylate (isomer 1) and *tert*-butyl (2*R*,5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-[4-({[(3*R*)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizin-3-yl]carbonyl}amino)benzyl]pyrrolidine-1-carboxylate (isomer 2)



To a solution of 0.610 g (1.60 mmol) of Intermediate i-13a and 0.300 g (1.67 mmol) of Intermediate i-46 in 3.2 mL of anhydrous *N,N*-dimethylformamide under an atmosphere of nitrogen was added 0.033 g (0.24 mmol) of 1-hydroxy-7-azabenzotriazole followed by 0.336 g (1.75 mmol) of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride. The resulting suspension was stirred at ambient temperature for 30 min, quenched with water, and extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography eluting with a 50-100% gradient of ethyl acetate in hexanes to afford the title compounds as a mixture of diastereomers in a 97:3 ratio. The two diastereomers were separated by chiral HPLC employing a Daicel CHIRALPAK® AD® column (eluent: 40% IPA in Heptane). The first eluting diastereomer was designated as Isomer 2 and is a colorless solid (0.020 g, 2.3%). LC-MS: *m/z* (ES) 544.2 (MH)⁺. The second eluting diastereomer was designated as Isomer 1 and is a colorless solid (0.650 g, 75%). LC-MS: *m/z* (ES) 544.2 (MH)⁺.

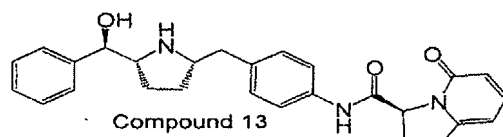
Step B (Compound 12): (3*S*)-*N*-[4-({(2*S*,5*R*)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl]phenyl]-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxamide



A solution of 0.500 g (0.920 mmol) of Isomer 1 from step A above in 2 mL of isopropanol under an atmosphere of nitrogen was added 4.0 mL of a 4.0 M solution of anhydrous hydrogen chloride in 1,4-dioxane. The reaction mixture was stirred for 1 h and then evaporated to dryness *in vacuo*. The crude reaction mixture was purified by reverse phase HPLC (TMC

Pro-Pac C18; 0-75% 0.01% trifluoroacetic acid in acetonitrile/ 0.01% trifluoroacetic acid in water gradient). The pure fractions were lyophilized overnight then dissolved in a mixture of 10 mL of chloroform and 4 mL of a saturated aqueous bicarbonate solution. The biphasic mixture was stirred vigorously for 10 min, then the layers were separated. The aqueous phase was extracted with chloroform (3 x 10 mL) and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo* to afford the title compound (Compound 12) as a white solid (0.39 g, 95%). ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.89 (s, 1 H), 7.54 (dd, *J* = 8.8, 7.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.34-7.29 (m, 4H), 7.26-7.23 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.38-3.36 (m, 2H), 5.24 (dd, *J* = 9.4, 2.8 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.35-3.23 (m, 3H), 3.19-3.12 (m, 1H), 2.82-2.71 (m, 2H), 2.60-2.51 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 1H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.52-1.43 (m, 3H). LC-MS: *m/z* (ES) 444.0 (MH)⁺.

Step B (Compound 13): (3*R*)-*N*-[4-({(2*S*,5*R*)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl}methyl)phenyl]-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroindolizine-3-carboxamide

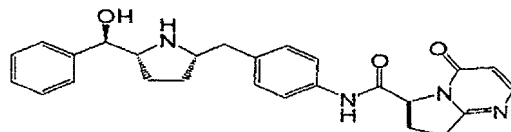


The same procedure was employed for the deprotection of Isomer 2 from Step A above to afford the title compound (Compound 13) as a single diastereomer. LC-MS: *m/z* (ES) 444.0 (MH)⁺.

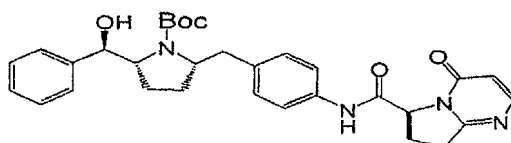
Using the Biological Assays as described herein, the human β3 functional activities of Compounds 12 and 13 were determined to be between 1 to 10 nM and less than 1 nM, respectively.

Compound 14

(6*S*)-*N*-[4-({(2*S*, 5*R*)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl}methyl)phenyl]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-*α*]pyrimidine-6-carboxamide

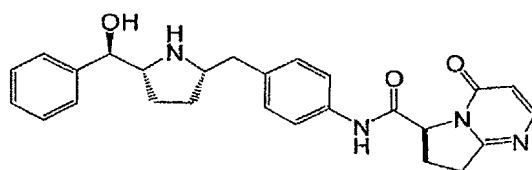


Step A: *Tert*-butyl(2*R*, 5*S*)-2-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]-5-[4-({[(6*S*)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2-*α*]pyrimidin-6-yl]carbonyl}amino)benzyl]pyrrolidine-1-carboxylate



To a solution of i-13a (21.4 g, 55.9 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (100 ml) at 0 °C was added [(6*S*)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2- α]pyrimidine-6-carboxylic acid (i-44, 11.1 g, 61.5 mmol), followed by 1-hydroxybenzotriazole (7.55 g, 55.9 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (16.1 g, 84.0 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (29.2 ml, 168 mmol). The reaction mixture was stirred from 0 °C to ambient temperature for 2 h. Water (600 ml) was added and it was extracted with dichloromethane (600 ml x 2). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄. After removal of the volatiles, the residue was purified by using a Biotage Horizon® system (0-5% then 5% methanol with 10% ammonia/dichloromethane mixture) to afford the title compound which contained 8% of the minor diastereomer. It was further purified by supercritical fluid chromatography (chiral AS column, 40% methanol) to afford the title compound as a pale yellow solid (22.0 g, 72%). ¹H NMR (CDCl₃): δ 9.61 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35-7.28 (m, 5H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.12-4.04 (m, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.15-3.06 (m, 2H), 2.91 (dd, *J* = 13.1, 9.0 Hz, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.71-1.49 (m, 13H). LC-MS 567.4 (M+23).

Step B: (6*S*)-*N*-[4-({(2*S*, 5*R*)-5-[(*R*)-hydroxy(phenyl)methyl]pyrrolidin-2-yl)methyl}phenyl)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydropyrrolo[1,2- α]pyrimidine-6-carboxamide



To a solution of the intermediate from Step A (2.50 g, 4.59 mmol) in dichloromethane (40 ml) was added trifluoroacetic acid (15 ml). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1.5 h. After removal of the volatiles, saturated NaHCO₃ was added to make the PH value to 8-9. The mixture was then extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄. After concentration, crystallization from methanol/acetonitrile afforded the title compound as a white solid (1.23g, 60%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 10.40 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.32-7.26 (m, 4H), 7.21 (m, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.23 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 5.11 (dd, *J* = 9.6, 2.9 Hz, 1H), 5.10 (br, 1H), 4.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.20-3.00 (m, 4H), 2.66-2.51 (m, 3H), 2.16 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.29-1.23 (m, 2H). LC-MS 445.3 (M+1).

Using the Biological Assays as described herein, the human β 3 functional activity of Compound 14 was determined to be between 11 to 100 nM.

Compounds 15 – 29 were prepared using procedures similar to those described above from the appropriate starting materials.

Biological Assays for β 3 Functional Activities: The following in vitro assays are suitable for screening compounds that have selective β 3 agonist activity:

Functional Assay: cAMP production in response to ligand is measured according to Barton, *et al.* (1991, Agonist-induced desensitization of D2 dopamine receptors in human Y-79 retinoblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* v3229:650-658) modified as follows. cAMP production is measured using a homogenous time-resolved fluorescence resonance energy transfer immunoassay (LANCET[™], Perkin Elmer) according to the manufacture's instructions. Chinese hamster ovary (CHO) cells, stably transfected with the cloned β -adrenergic receptor (β 1, β 2 or β 3) are harvested after 3 days of subculturing. Harvesting of cells is done with Enzyme-free Dissociation Media (Specialty Media). Cells are then counted and resuspended in assay buffer (Hank's Balanced salt solution supplemented with 5mM HEPES, 0.1% BSA) containing a phosphodiesterase inhibitor (IBMX, 0.6mM). The reaction is initiated by mixing 6,000 cells in 6 μ L with 6 μ L Alexa Fluor labeled cAMP antibody (LANCET[™] kit) which is then added to an assay well containing 12 μ L of compound (diluted in assay buffer to 2X final concentration). The reaction proceeds for 30 min at room temperature and is terminated by the addition of 24 μ L detection buffer (LANCET[™] kit). The assay plate is then incubated for 1 h at room temperature and time-resolved fluorescence measured on a Perkin Elmer Envision reader or equivalent. The unknown cAMP level is determined by comparing fluorescence levels to a cAMP standard curve.

The non-selective, full agonist β -adrenergic ligand isoproterenol is used at all three receptors to determine maximal stimulation. The human β 3 adrenergic receptor (AR) selective ligand (S)-N-[4-[2-[[2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino]ethyl]-phenyl]-4-iodobenzenesulfonamide is used as a control in all assays. Isoproterenol is titrated at a final concentration in the assay of 10^{-10} M to 10^{-5} and the selective ligand (S)-N-[4-[2-[[2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino] ethyl]phenyl]-4-iodobenzenesulfonamide is titrated at the β 3 receptor at concentration of 10^{-10} M to 10^{-5} M. Unknown ligands are titrated at all 3 β -adrenergic receptor subtypes at a final concentration in the assay of 10^{-10} M to 10^{-5} M to determine the EC_{50} . The EC_{50} is defined as the concentration of compound that gives 50% activation of its own maximum. Data are analyzed using Microsoft Excel and Graphpad Prism or an internally developed data analysis software package.

Binding Assay: Compounds are also assayed at the β 1 and β 2 receptors to determine selectivity. All binding assays are run using membranes prepared from CHO cells recombinantly expressing β 1 or β 2 receptors. Cells are grown for 3-4 days post splitting; the attached cells are washed with PBS and then lysed in 1mM Tris, pH 7.2 for 10 min on ice. The flasks are scraped to remove the cells and the cells then homogenized using a Teflon/glass homogenizer. Membranes are collected by centrifuging at 38,000 x g for 15 min at 4°C. The pelleted membranes are resuspended in TME buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA) at a concentration of 1 mg protein/mL. Large batches of membranes can be prepared,

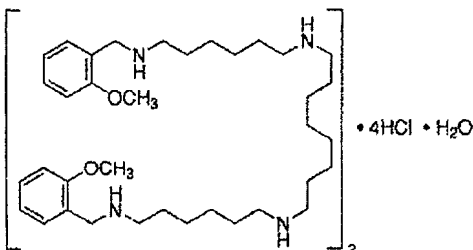
aliquoted and stored at -70°C for up to a year without loss of potency. The binding assay is performed by incubating together membranes (2-5 µg of protein), the radiolabelled tracer ¹²⁵I-cyanopindolol (¹²⁵I-CYP, 45pM), 200 µg of WGA-PVT SPA beads (GE Healthcare) and the test compounds at final concentrations ranging from 10⁻¹⁰ M to 10⁻⁵ M in a final volume of 200 µL of TME buffer containing 0.1% BSA. The assay plate is incubated for 1 h with shaking at room temperature and then placed in a Perkin Elmer Trilux scintillation counter. The plates are allowed to rest in the Trilux counter for approximately 10 h in the dark prior to counting. Data are analyzed using a standard 4-parameter non-linear regression analysis using either Graphpad Prism software or an internally developed data analysis package. The IC₅₀ is defined as the concentration of the compound capable of inhibiting 50% of the binding of the radiolabelled tracer (¹²⁵I-CYP). A compound's selectivity for the β₃ receptor may be determined by calculating the ratio (IC₅₀ β₁ AR, β₂ AR)/(EC₅₀ β₃ AR).

The β_3 -AR agonist and the antimuscarinic agent can be administered to the patient at a weight ratio of 500:1 to 1:50. In one embodiment, the weight ratio of the β_3 -AR agonist and the antimuscarinic agent is 300:1 to 1:10. In another embodiment, the weight ratio is 300:1 to 1:1. In another embodiment, the weight ratio is 150:1 to 1:1. In another embodiment, the weight ratio is 100:1 to 1:1. In yet another embodiment, the weight ratio is 150:1. In still another embodiment, the weight ratio is 100:1.

The combination therapy may further comprise a selective M₂ antagonist in addition to a β 3-AR agonist and an antimuscarinic agent.

As used herein, the phrase "selective M₂ antagonist" is a compound which antagonizes muscarinic M₂ subtype at greater than 10-fold selectivity as compared to another muscarinic subtype, for example, M₃ subtype. See Delmendo, Br J Pharmacol. 1989 Feb; 96(2) : 457-64, which is incorporated herein by reference in its entirety, for discussions of selective antagonists.

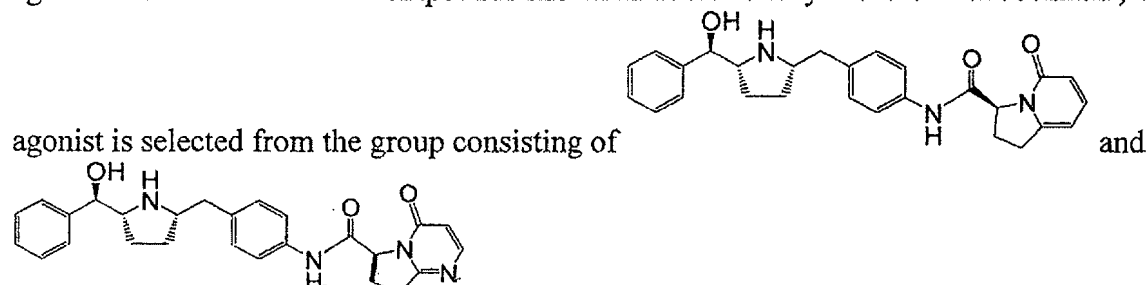
In one embodiment, the selective M₂ antagonist is methoctramine. Methoctramine is a polymethylene tetramine derivative having the following structure:



In one embodiment, a method of treating OAB comprises administering to a patient in need thereof a $\beta 3$ -AR agonist, an antimuscarinic agent, and a selective M_2 antagonist. In one embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than about 40. In another embodiment, the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than about 50. In one

embodiment, the antimuscarinic agent is darifenacin. In one embodiment, the M_2/M_3 ratio is measured using the receptor binding assays described in Ohtake-et al.

In one embodiment, a method of treating OAB comprises administering to a patient in need thereof a β_3 -AR agonist, darifenacin, and methoctramine. In another embodiment, the β_3 -AR agonist is selected from the compounds shown in Table 3. In another embodiment, the β_3 -AR agonist is selected from the compounds shown in Table 4. In yet another embodiment, the β_3 -AR



In a method wherein a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent, and a selective M_2 antagonist are administered to a patient, the β_3 -AR agonist can be pre-treated with the selective M_2 antagonist. In one embodiment, the selective M_2 antagonist is methoctramine. In another embodiment, the antimuscarinic agent is darifenacin. In another embodiment, the β_3 -AR agonist is pre-treated with methoctramine. In yet another embodiment, the pre-treated β_3 -AR agonist with methoctramine is co-administered with darifenacin.

In one embodiment, the concentration of methoctramine for the pre-treatment is 0.1 - 10 μ M. In another embodiment, the concentration of methoctramine for the pre-treatment is 1 μ M.

In the combination therapies described above, the β_3 -AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M_2 antagonist can be administered to a patient simultaneously, sequentially or separately.

In one embodiment, the β_3 -AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M_2 antagonist are administered to the patient simultaneously. In another embodiment, the β_3 -AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M_2 antagonist are administered to the patient separately. In yet another embodiment, β_3 -AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M_2 antagonist are administered to the patient sequentially.

Suitable patients include, but are not limited to, people with overactive bladder or lower urinary tract symptoms (LUTS). In one embodiment, the patient is a woman with OAB conditions. In another embodiment, the patient is a menopausal woman with OAB conditions.

Another aspect of the present invention provides a combination pharmaceutical composition comprising a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent, and an optional selective M_2 antagonist. Suitable β_3 -AR agonists, antimuscarinic agents, and selective M_2 antagonists are as described above.

Suitable amount of the β_3 -AR agonist in the combination composition is from about 0.01 mg to about 500 mg. In one embodiment, the amount of the β_3 -AR agonist is from about 0.05 mg to about 250 mg. In another embodiment, the amount is from about 0.1 mg to about 150 mg. In another embodiment, the amount is from about 1 to about 100 mg. In yet
5 another embodiment, the amount is from about 1 to about 50 mg.

Suitable amount of the antimuscarinic agent in the combination composition is from about 0.01 mg to about 50 mg. In one embodiment, the amount of the antimuscarinic agent is from about 0.05 mg to about 12 mg. In another embodiment, the amount is from about 0.1 mg to about 6 mg. In another embodiment, the amount is from about 0.2 to about 5 mg. In yet
10 another embodiment, the amount is from about 0.2 to about 3 mg.

Suitable amount of the selective M_2 antagonist is from about 0.01 mg to about 50 mg. In one embodiment, the amount of the selective M_2 antagonist is from about 0.05 mg to about 15 mg.

In practical use, the β_3 -AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional
15 selective M_2 antagonist can be combined as the active ingredients in intimate admixture with a pharmaceutical carrier according to conventional pharmaceutical compounding techniques. The carrier may take a wide variety of forms depending on the form of preparation desired for administration, e.g., oral or parenteral (including intravenous). In preparing the compositions for oral dosage form, any of the usual pharmaceutical media may be employed, such as, for
20 example, water, glycols, oils, alcohols, flavoring agents, preservatives, coloring agents and the like in the case of oral liquid preparations, such as, for example, suspensions, elixirs and solutions; or carriers such as starches, sugars, microcrystalline cellulose, diluents, granulating agents, lubricants, binders, disintegrating agents and the like in the case of oral solid preparations such as, for example, powders, hard and soft capsules and tablets, with the solid oral preparations
25 being preferred over the liquid preparations.

Because of their ease of administration, tablets and capsules represent the most advantageous oral dosage unit form in which case solid pharmaceutical carriers are employed. If desired, tablets may be coated by standard aqueous or non-aqueous techniques. Such combination compositions and preparations can contain 0.1 - 20 percent of each active
30 ingredient. The percentage of active ingredients in these combination compositions may, of course, be varied and the amount of active ingredients in such compositions is such that an effective dosage will be obtained.

The active ingredients can also be administered intranasally as, for example, liquid drops or spray.

35 The tablets, pills, capsules, and the like may also contain a binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch or gelatin; excipients such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, alginic acid; a lubricant such as magnesium stearate; and a sweetening agent such as sucrose, lactose or saccharin. When a

dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier such as a fatty oil.

Various other materials may be present as coatings or to modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or
5 elixir may contain, in addition to the active ingredient, sucrose as a sweetening agent, methyl and propylparabens as preservatives, a dye and a flavoring such as cherry or orange flavor.

The active ingredients may also be administered parenterally. Solutions or suspensions of these active ingredients can be prepared in water suitably mixed with a surfactant such as hydroxy-propylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid
10 polyethylene glycols and mixtures thereof in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The combination compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the
15 extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (e.g. glycerol, propylene glycol and liquid polyethylene glycol), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

In one embodiment, the combination composition is an oral composition. In another embodiment, the oral composition is a capsule gel. In yet another embodiment, the combination composition is an oral tablet composition. In still another embodiment, the combination composition is an oral bead composition.

In one embodiment, the combination composition is a controlled release
25 composition wherein the antimuscarinic agent is released over 24 hours upon the administration of the composition. In another embodiment, the antimuscarinic agent is released over 10 hours. In yet another embodiment, the antimuscarinic agent is released over 8 hours. In still another embodiment, the antimuscarinic agent is released over 6 hours.

Disclosed herein also include use of a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent,
30 and an optional selective M_2 antagonist in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of overactive bladder.

EXAMPLES

The effects of co-administration of a β_3 -AR agonist, an antimuscarinic agent, and
35 an optional M_2 antagonist are illustrated in the following examples.

CL 316243, or disodium (R,R)-5-(2-((2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl)-amino)propyl)-1,3-benzodioxole-2,3-dicarboxylate, is a β_3 -AR agonist. CL 316243 is described in more detail in J. Med. Chem. 1992 Aug 7;35(16):3081-4.

Tolterodine, or 2-[(1*S*)-3-(diisopropylamino)-1-phenylpropyl]-4-methylphenol, is an antimuscarinic agent used to treat overactive bladder. Tolterodine is described in more detail in US Patent Nos. 5,382,600, 6,630,162, 6,770,295, and 6,911,217.

Oxybutynin, or 4-diethylaminobut-2-ynyl-2-cyclohexyl-2-hydroxy-2-phenylethanoate, is an antimuscarinic agent used to relieve urinary and bladder difficulties, including frequent urination and inability to control urination (urge incontinence), by decreasing muscle spasms of the bladder.

Darifenacin, or (S)-2-[1-[2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethyl]pyrrolidin-3-yl]-2,2-diphenylacetamide, is an antimuscarinic agent used to treat urinary incontinence.

Darifenacin is described in more detail in US Patent No. 5,096,890.

EXAMPLES 1 - 3

Materials and Methods

The following materials and methods were used for Examples 1–3. Male adult Sprague-Dawley rats were used. After euthanizing using CO₂ gas, a whole bladder was removed. Longitudinal strips (about 6 mm × 3 mm) of the extratrigoal portion of the detrusor muscle were prepared. Each strip was placed in a warmed (37°C) organ bath (25 mL) containing oxygenated (95% O₂ + 5% CO₂) Krebs solution. The strips were tied at one end to the organ bath, and connected at the other end to an isometric transducer (AD Instruments) under a resting tension of 10 mN. The responses of the preparations were recorded at a sampling rate of 10 Hz by a multiple channel data acquisition system (PowerLab, AD Instruments), and measured with an analysis software (Chart, AD Instruments). After the equilibration period for at least 60 min, each tissue strip was challenged to electrical field stimulation (EFS) at 60 Hz; duration, 0.3 ms; 3 sec; 90 V to induce contractions. Upon obtaining stable contractions with EFS, compound solution (25 µL) was applied into organ bath in a cumulative manner. After 15 min of each compound treatment, EFS was applied.

Isobologram Analysis

Isobologram Analysis was used to evaluate the synergic effect of a combination therapy. Isobologram Analysis provides a visual assessment of the interaction of two different agents using independent statistical analysis. The statistical analysis can be accomplished from calculations of certain potency indices from single treatment of each compound and fixed-ratio combinations for the same effect. Isobologram Analysis is described in more detail in JPET 298:865–872, 2001, which is incorporated herein by reference in its entirety.

An illustrative diagram of Isobologram Analysis is shown in FIG. 1. In FIG. 1, Isobologram for some particular effect (e.g., 50% of the maximum) in which the dose of active agent A alone is A = 20 and active agent B alone is B = 100. The straight line connecting these intercept points (additivity line) is the locus of all dose pairs that, based on these potencies,

should give the same effect. An actual dose pair such as point Q attains this effect with lesser quantities and is synergistic (or super-additive), while the dose pair denoted by point R means greater quantities are required and is therefore sub-additive. A point such as P that appears close to the A-B line is simply additive. A suitable statistical analysis is often used to demonstrate the nature of the interaction.

EXAMPLE 2
Combination Therapy of β_3 -AR Agonist CL316243 with an Antimuscarinic Agent Selected from Tolterodine, Oxybutynin, and Darifenacin

When administered individually, each of CL316243, tolterodine, oxybutynin and darifenacin inhibited the EFS-induced isolated detrusor muscle contractions. Table 5 shows the concentration of each compound which induced 25% inhibition. These values were used for the following isobologram analyses.

Table 5. Inhibition of detrusor contraction with CL316243, tolterodine, oxybutynin and darifenacin

Compound	IC ₂₅ (nM)
β_3 -AR agonist	
CL316,243	2.86
Antimuscarinic	
Tolterodine	4.71
Oxybutynin	22.28
Darifenacin	5.84

In the combination therapy, CL316243 was co-administered with tolterodine, oxybutynin or darifenacin at fixed weight ratios and the results from isobologram analyses are shown in Figure 2. Figure 2 indicates that combinations of CL316243 with tolterodine (1:2, Figure 2A) or oxybutynin (1:10, Figure 2B) showed synergistic effects. On the other hand, the combination of CL316243 with darifenacin (1:2, Figure 2C) appears to be simply additive (i.e., no synergistic effect).

While not wishing to be bound by theory, it is generally believed that M3 antagonistic activity of an antimuscarinic agent is important for OAB efficacy (see, for example, Abrams and Andersson. BJU Int, 100, 987-1006 (2007)). It has now surprisingly been found that the relative selectivity of M₂/M₃ of the antimuscarinic agent may play an important role for the OAB efficacy and/or reduced side effects in the combination therapy using the antimuscarinic agent and a β_3 -AR agonist.

As can be seen from the results above, antimuscarinic agent tolterodine has about equal selectivity on M₂ and M₃ subtypes of the muscarinic receptors ($M_2/M_3 \approx 1$), and the combination of tolterodine and CL316243, a β_3 -AR agonist, at 2:1 ratio provided synergistic effect. Another antimuscarinic agent oxybutynin, which has M₂/M₃ ratio of about 6, also
5 provided synergistic effect when combined with CL316243 at 10:1 ratio.

On the other hand, darifenacin which has much higher selectivity for M₃ than M₂ ($M_2/M_3 \approx 50$), did not provide synergy when combined with CL316243 at 2:1 ratio.

In summary, the combination of CL316243 with tolterodine or oxybutynin, each of which has M₂/M₃ ratio of less than 40, provided synergy in the inhibition of detrusor
10 contraction. On the other hand, the combination of CL316243 with darifenacin, which has M₂/M₃ ratio of greater than 40, did not provide synergy.

EXAMPLE 3

β_3 -AR Agonist Compound 12 in combination with Tolterodine or Darifenacin

15 In this example, a different β_3 -AR Agonist was used to study the synergistic effect of the combination therapy of a β_3 -AR Agonist and an antimuscarinic agent.

The β_3 -AR agonist Compound 12 described above in Table 3 inhibited the EFS-induced isolated detrusor muscle contractions with an IC₂₅ value of 275 nM. Thus Compound 12 is nearly 100 times less potent than CL316243 (IC₂₅ 2.86 nM, see Table 5) in inhibiting the
20 EFS-induced contraction of rat bladder strips. This is consistent with less potent activity of Compound 12 at rat β_3 -AR.

In the combination study, Compound 12 was co-administered with tolterodine or darifenacin at a fixed weight ratio of 50:1. The isobologram analyses results are shown in FIG. 3. FIG. 3 indicates that the combination of Compound 12 with tolterodine, which has M₂/M₃ of
25 about 1, at 50:1 ratio (FIG. 3A), provided synergistic effect.

On the other hand, the combination of Compound 12 with darifenacin, which has M₂/M₃ of about 50, at 50:1 ratio (FIG. 3B), did not provide synergistic effect (sub-additive).

The above results are consistent with the results observed in Example 1, where a different β_3 -AR agonist (CL316243) was used in the studies. These results suggest that when the
30 antimuscarinic agent has M₂/M₃ ratio of less than 40, its combination with a β_3 -AR agonist provided synergy in the inhibition of detrusor contraction. On the other hand, when the antimuscarinic agent has M₂/M₃ ratio of greater than 40, its combination with a β_3 -AR agonist provided no synergy.

EXAMPLE 4

Effect of Selective M₂ Antagonist on the Synergistic Effect of the Combination Therapy

In this example, the effect of a selective M₂ antagonist on the combination therapy of a β_3 -AR agonist and an antimuscarinic agent having M₂/M₃ ratio of greater than 40 is studied.

First, CL 316243, a β_3 -AR agonist, was either un-treated or pre-treated with methoctramine (1 μ M) and the results are shown in FIG. 4. FIG. 4 shows that pretreatment of CL316243 with methoctramine did not significantly affect the potency of CL316243 with regard to inhibiting the EFS-induced bladder contraction. This result is consistent with the general belief that a selective M₂ antagonist alone does not relax pre-contracted rat bladder strips as do β_3 -AR agonists and antimuscarinics with M₃ antagonism. This suggests that the combination of a selective M₂ antagonist and CL316243, and without the presence of M₃ antagonism, did not provide synergism.

Next, each of the un-treated (A) and pre-treated CL316243 (B) was combined with darifenacin, respectively, at a ratio of 1:2 and the results are shown in FIG. 5. FIG. 5 indicates that the combination of pre-treated CL316243 (with 1 μ M methoctramine) and darifenacin at 1:2 ratio provided synergistic effect. As discussed above, darifenacin is a selective M₃ antagonist and has M₂/M₃ ratio of about 50.

On the other hand, the combination of the un-treated CL316243 and darifenacin at the same ratio (1:2) was simply additive (i.e., no synergistic effect).

These results are consistent with the observations in Examples 1 and 2 that the synergistic effect of the combination between a β_3 -AR agonist and an antimuscarinic agent may require the presence of both M₂ and M₃ antagonism.

While not wishing to be bound by theory, it is believed that M₂ receptors may play a role in mediating an indirect contractile response by reversing adrenoceptor-mediated relaxation through a cAMP-dependent mechanism. M₂ antagonism may potentiate β_3 -AR agonist induced cAMP increase and BK channel opening, resulting in further relaxation of detrusor muscle.

EXAMPLE 5

Effect of Combination Ratios on the Synergistic Effect

Materials and Methods

Animals: female SD rats (200-250 g BW) (Seven groups in total).

Anesthesia: urethane (1.0 g/kg, ip).

Parameter: amplitude of distention-induced rhythmic bladder contraction.

Compounds: oxybutynin (OXY), CL 316243 (CL).

Analysis: isobologram using ID₂₀ values (doses decreasing amplitude by 20%).

First, single dosing study was conducted to calculate ID20 values of oxybutynin (OXY) and CL316243 (CL) at the following conditions and the ID20 values obtained are shown in Table 6:

Vehicle (saline);
OXY, 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg, iv;
CL, 0.003, 0.01, 0.03 mg/kg, iv.

Table 6. ID20 values of CL316243 and Oxybutynin.

Compound	ID20 (MPK, iv)-
Oxybutynin	0.057
CL316243	0.024

Results in Table 6 show that both oxybutynin and CL316243 decreased the amplitude of distention-induced rhythmic bladder contraction in anesthetized female rats.

Next, combination dosing regimens shown below in Table 7 were conducted to compose an isobologram. There were 9 groups in total. ID20 values of OXY and CL was calculated in each combination rate.

Table 7. Dosing Regimens (mg/kg).

OXY: CL	1:1	10:1	3:1
Regimen 1	0.003:0.003	0.03:0.003	0.01:0.003
Regimen 2	0.01:0.01	0.1:0.01	0.03:0.01
Regimen 3	0.03:0.03	0.3: 0.03	0.1:0.03

FIG. 6 indicates that synergistic effects were observed for combinations of CL and OXY at 1:1 and 1:10 ratios. On the other hand, the combination of CL and OXY at 1:3 only provided a simple additive, but not synergistic, effect.

These results suggest that the synergistic effect between the β 3-AR agonist CL and the antimuscarinic agent OXY also depends on the particular combination ratio in the combination.

Example 6

Combination Composition Comprising β 3-AR Agonist and Antimuscarinic Agent

An exemplary combination composition comprising a β 3-AR agonist and an antimuscarinic agent is shown in Table 8:

5 Table 8. Combination Composition of a β 3-AR agonist and an antimuscarinic Agent

Ingredient ID	Composition, wt%
CR formulation	
Antimuscarinic agent	0.01 - 5
β 3-AR agonist	0.1 - 10
Filler	10 - 95
Binder	0.1 - 10
Lubricant	0.1 - 5
CR coating	0.5 - 20
Coloring agent	0.1 - 10

Note: The weight percentage (wt%) in table 8 is based on the total weight of the combination composition.

10 In one embodiment, the β 3-AR agonist is selected from the compounds listed in Table 3. In another embodiment, the antimuscarinic agent is selected from tolterodine, fesoterodine, oxybutynin, solifenacin, propiverin, trospium, imidafenacin, and TD6301.

In one embodiment, the above combination composition is a controlled release (CR) formulation. In another embodiment, the combination composition is in a capsule gel for oral administration.

15 Example 7

Combination Composition Comprising CR Antimuscarinic Agent and IR β 3-AR Agonist

20 An exemplary combination composition comprising an antimuscarinic agent in a controlled release (CR) portion and a β 3-AR agonist in an immediate release (CR) portion is shown in Table 9:

Table 9. Combination Composition of a β 3-AR agonist and an antimuscarinic Agent

Ingredient ID	Composition, wt%
CR Beads of antimuscarinic agent	
Antimuscarinic agent	0.01 - 5
Filler	1 - 95
Binder	0.1 - 10
Lubricant	0.1 - 5

CR coating	0.5 - 20
Coloring agent	0.1 - 10
IR Beads of β 3-AR agonist	
β 3-AR agonist	0.1 - 10
Filler	1 - 95
Binder	0.1 - 10
Lubricant	0.1 - 5
IR coating	0.5 - 20
Coloring agent	0.1 - 10

Note: The weight percentage (wt%) in table 9 is based on the total weight of each respective portion of the combination composition.

In one embodiment, the β 3-AR agonist is selected from the compounds listed in Table 3. In another embodiment, the antimuscarinic agent is selected from tolterodine, fesoterodine, oxybutynin, solifenacin, propiverin, trospium, imidafenacin, and TD6301.

In one embodiment, the above composition is in a capsule gel for oral administration.

Example 8

Effect of Combination Therapy on Bladder Capacity in Rhesus Monkeys

Materials and Methods

Adult female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) weighed 5.3-6.2 kg (4-7 year-old) were used. The subjects were either paired or individually housed on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 AM). Their diet consisted of 2050 Teklad (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) and fresh fruit or vegetable. Water was freely available. All animals were observed daily by a veterinary technician and caretakers for signs of ill health. Subjects were repeatedly used with >13-day resting period. Monkeys were anesthetized with an intramuscular injection of either Telazol (3-5 mg/kg) or ketamine (10-20 mg/kg) followed by intravenous constant rate infusion with ketamine (0.2-0.8 mg/kg/min) using a syringe pump (552222, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Animals were placed in a supine position and a triple lumen balloon transurethral catheter (7.4 Fr, Cook Medical, Bloomington, IN) was inserted into the bladder and the balloon was inflated with 1 mL of water to secure the tip of catheter at the bladder base. The catheter was connected with an infusion pump (Gemini PC-2TX, ALARIS Medical Systems, San Diego, CA) for bladder filling and a pressure transducer for intravesical pressure monitoring. Intravesical pressure was continuously recorded using a multiple channel

data acquisition system (Power lab, AD Instruments, Biopac systems, Colorado Springs, CO) at a sampling rate of 20 Hz. After confirming bladder emptiness by an ultrasonography (Logiq e vet, GE Medical Systems, Waukesha, WI, Fig. 1A), saline was intravesically infused at 15 mL/min. When the steep rise in pressure indicative of the micturition reflex was observed, intravesical infusion was stopped and the bladder was manually emptied with a 60 ml syringe. After two baseline cystometry readings, drug was intravenously administered three times using a rising dose paradigm with a cystometry performed 10 min after each dose. Bladder capacity was measured for each cystometry and % change from the baseline capacity was calculated. As used herein, the term "baseline capacity" or "baseline" means the average bladder capacity from two pre-dose measurements.

Mono-therapies using either tolterodine ("TOL"), darifenacin (DAR") or Compound 14 (Cpd 14") at various doses and combination therapies of TOL:Cpd 14 and DAR:Cpd 14 at different doses and dose ratios as shown in Table 10 were tested in rhesus monkeys.

Table 10. Doses and Dose Ratios of Mono-therapies and Combination Therapies

		Dose Ratio						
		Compound 14 (mg/kg)						
	Dose	0 (vehicle)	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1
Tolterodine (mg/kg)	0 (vehicle)	Vehicle	Mono	Mono	Mono	Mono	Mono	Mono
	0.01	Mono	3.3:1	1:1				
	0.03	Mono	10:1	3:1	1:1			
	0.1	Mono			3.3:1	1:1		1:10
Darifenacin (mg/kg)	0.01	Mono		1:1	1:3			
	0.03	Mono			1:1	1:3.3		
	0.1	Mono				1:1	1:3	

Using the above mono-therapies and combination therapies, the bladder capacity results in rhesus monkeys are summarized in Table 11. The reported results are mean values of % change from baseline in 4-6 animals.

Table 11. Bladder Capacity Results Using Mono-therapies and Combination Therapies in Rhesus Monkeys

		Bladder Capacity as Measured in % Change from Baseline						
		Compound 14 (mg/kg)						
		0 (vehicle)	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1
TOL (mg/kg)	0 (vehicle)	-0.13%	4.1%	18.0%	27.3%	33.9%	31%	55.9%
	0.01	8.6%	28.2%	31.0%				
	0.03	16.8%	35.5%	36.4%	43.5%			
	0.1	40.3%			62.9%	56.8%		69.6%
DAR (mg/kg)	0.01	8.9%		13.7%	23.7%			
	0.03	18.3%			37.1%	43.3%		
	0.1	29.4%				58.0%	68.7%	

5 It can be seen from Table 11 that all combinations of Compound 14 and
tolterodine tested showed greater bladder capacity as compared to each respective mono-therapy.
It is to be noted that at the lowest dose of compound 14 (0.003 mg/kg), the synergistic effects of
the combinations were much larger. Specifically, the combination of Cpd 14:TOL at 0.003
mg/kg:0.01 mg/kg showed bladder capacity increase of 28.2% as compared to 4.1% and 8.6%
10 for the respective mono-therapies. Similarly, the combination of Cpd 14:TOL at 0.003
mg/kg:0.03 mg/kg showed bladder capacity increase of 35.5% as compared to 4.1% and 16.8%
for the respective mono-therapies.

 For combination therapies of Compound 14 and darifenacin, combinations
showed superior bladder capacity effect at higher doses of darifenacin (0.03, 0.1 mg/kg).

15 Tolterodine, a non-selective muscarinic antagonist, clearly demonstrated
improved efficacy with Compound 14 at the examined combinations, while additional efficacy
with darifenacin, a selective M3 antagonist, and Compound 14 combinations was limited only at
higher doses. These results suggest that both M2 and M3 antagonism of an antimuscarinic agent
may be important for improved efficacy when combined with a β 3-AR agonist.

20 While the invention has been described and illustrated with reference to certain
particular embodiments thereof, those skilled in the art will appreciate that various changes,
modifications and substitutions can be made therein without departing from the spirit and scope

41

of the invention. For example, effective dosages other than the particular dosages as set forth herein above may be applicable as a consequence of variations in the responsiveness of the mammal being treated for any of the indications for the active agents used in the instant invention as indicated above. Likewise, the specific pharmacological responses observed may
5 vary according to and depending upon the particular active compound selected or whether there are present pharmaceutical carriers, as well as the type of formulation employed, and such expected variations or differences in the results are contemplated in accordance with the objects and practices of the present invention. It is intended, therefore, that the invention be defined by the scope of the claims which follow and that such claims be interpreted as broadly as is
10 reasonable.

WHAT IS CLAIMED IS:

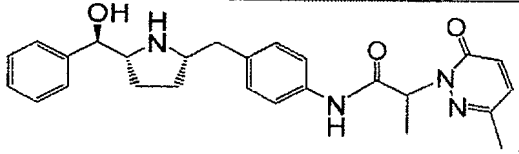
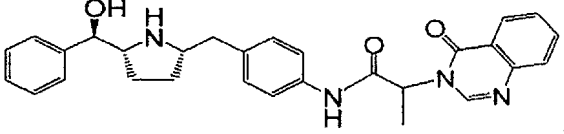
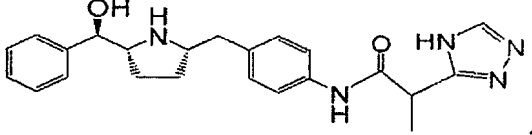
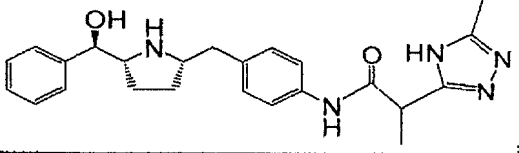
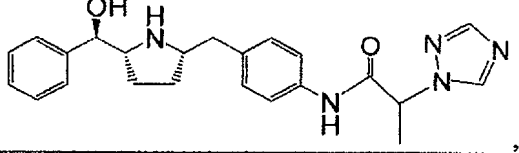
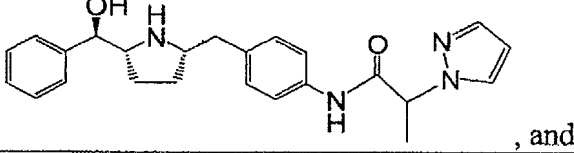
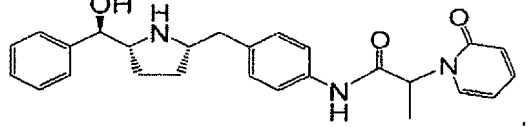
1. A method of treating overactive bladder, wherein the method comprises administering to a patient in need thereof:

- 5 a β 3-AR agonist,
an antimuscarinic agent, and
an optional selective M_2 antagonist;

wherein the β 3-AR agonist is selected from the group consisting of:

Compound #	Structure
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	

2. The method of Claim 1, wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than 40.

3. The method of Claim 2, wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than 20.

4. The method of Claim 2, wherein the antimuscarinic agent is selected from the group consisting of: tolterodine, fesoterodine, oxybutynin, solifenacin, propiverin, trospium, imidafenacin, and TD6301.

5. The method of Claim 4, wherein the antimuscarinic agent is tolterodine or oxybutynin.

6. The method of Claim 1, wherein the $\beta 3$ -AR agonist is selected from the group consisting of:

Compound #	Structure
11	
12	
13	
14	
26	

7. The method of Claim 6, wherein the β 3-AR agonist and the antimuscarinic agent are administered to the patient at a weight ratio of 300:1 to 1:10.

8. The method of Claim 6, wherein the antimuscarinic agent is tolterodine, and wherein the β_3 -AR agonist and tolterodine are administered to the patient at a weight ratio of 300:1 to 1:1.

9. The method of claim 1, wherein the method comprises administering to the patient:

a β_3 -AR agonist,
an antimuscarinic agent, and
a selective M₂ antagonist.

10. The method of Claim 9, wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of greater than 40.

11. The method of Claim 10, wherein the antimuscarinic agent is darifenacin and the selective M₂ antagonist is methoctramine.

12. A method of treating overactive bladder, wherein the method comprises administering to a patient in need thereof:

CL316243, and

oxybutynin;

wherein CL316243 and oxybutynin are administered to the patient at a weight ratio of 1:1 or 1:10.

13. The method of Claim 1, wherein the β 3-AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M₂ antagonist are administered simultaneously, separately or sequentially.

14. The method of Claim 1, wherein the β 3-AR agonist, the antimuscarinic agent, and the optional selective M₂ antagonist are administered orally.

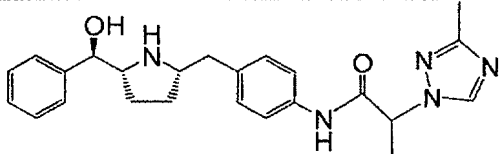
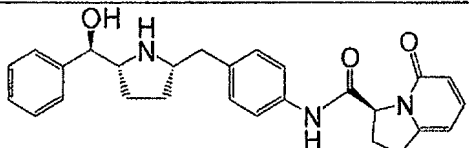
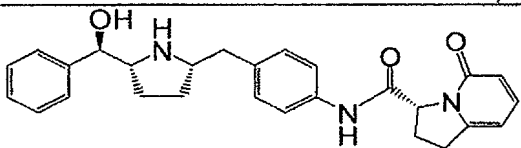
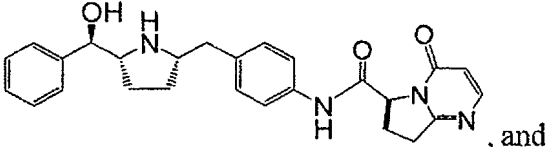
15. A pharmaceutical composition comprising:

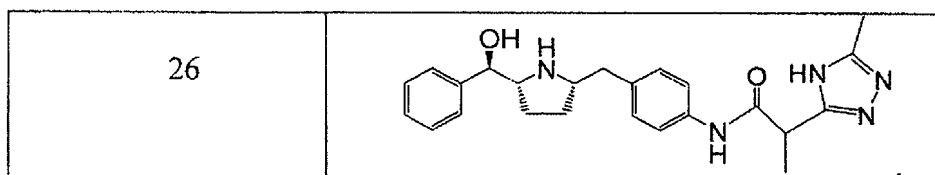
a β 3-AR agonist,

an antimuscarinic agent, and

an optional selective M₂ antagonist;

wherein the β 3-AR agonist is selected from the group consisting of:

Compound #	Structure
11	
12	
13	
14	



16. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the composition comprises:

a β 3-AR agonist, and

an antimuscarinic agent; and

wherein the antimuscarinic agent has an M_2/M_3 ratio of less than 40.

17. The pharmaceutical composition of claim 16, wherein the antimuscarinic agent is selected from the group consisting of: tolterodine, oxybutynin, fesoterodine, solifenacin, propiverine, and trospium.

18. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the composition comprises:

a β 3-AR agonist,

an antimuscarinic agent, and

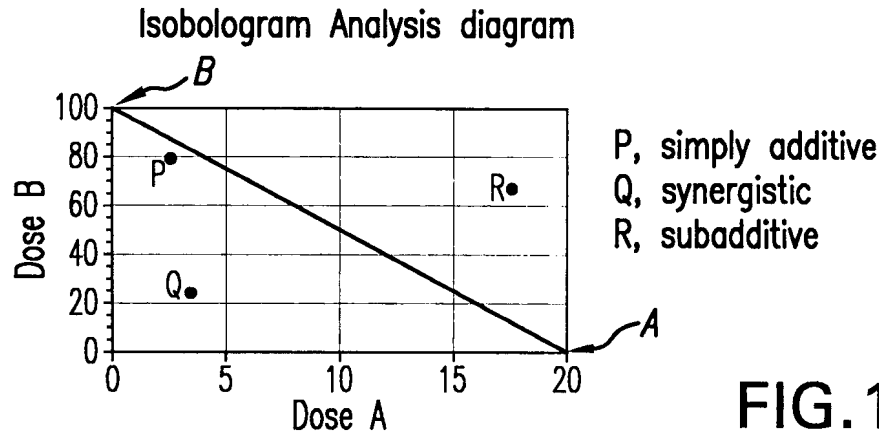
a selective M_2 antagonist;

wherein the antimuscarinic agent is darifenacin, and

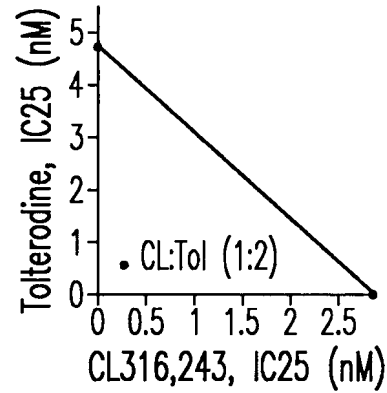
wherein the selective M_2 antagonist is methoctramine.

19. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the composition is a tablet or capsule for oral administration.

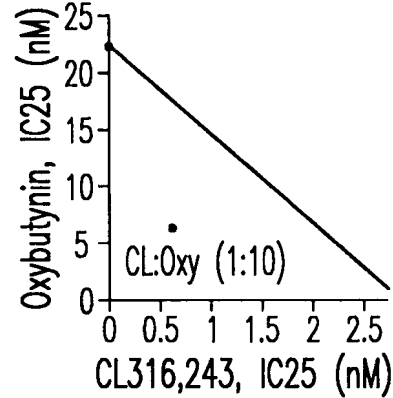
20. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the composition provides controlled release of the antimuscarinic agent.



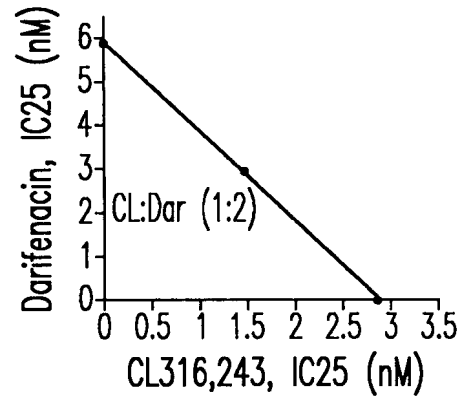
Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 with tolterodine.



Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 with oxybutynin.



Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of CL316243 with darifenacin.



2/3

Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of Compound 12 and tolterodine.

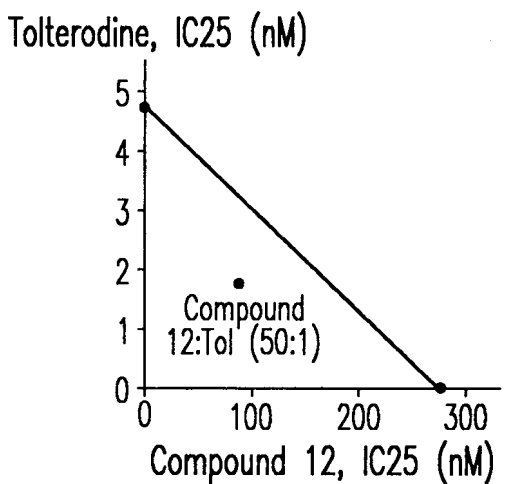


FIG.3A

Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of Compound 12 and darifenacin.

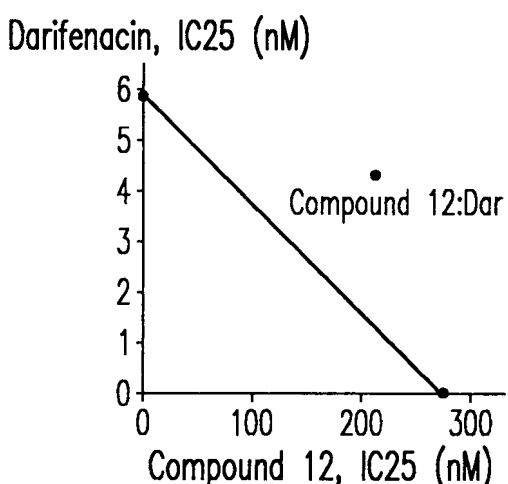


FIG.3B

Un-treated CL316243 (Circle) and Pre-treated CL316243 (Dot) with Methoctramine.

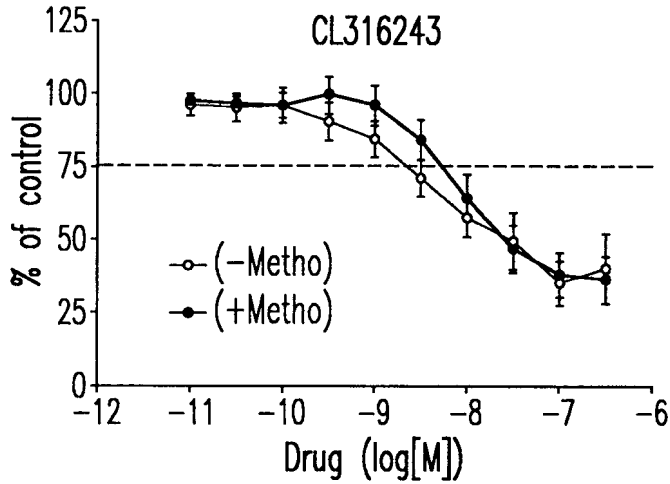


FIG.4

Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of darifenacin and un-treated CL316243.

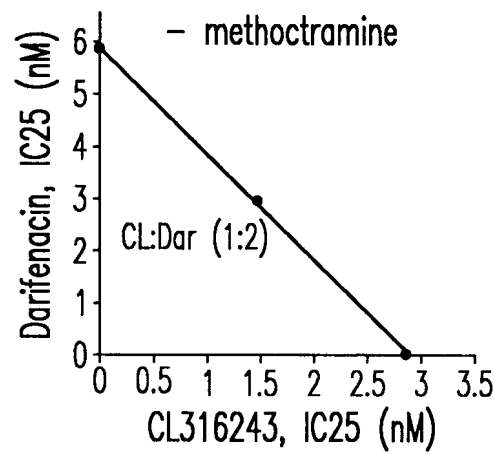


FIG.5A

Isobolograms of the inhibition of detrusor contraction induced by the combinations of pre-treated CL316243 with methoctramine.

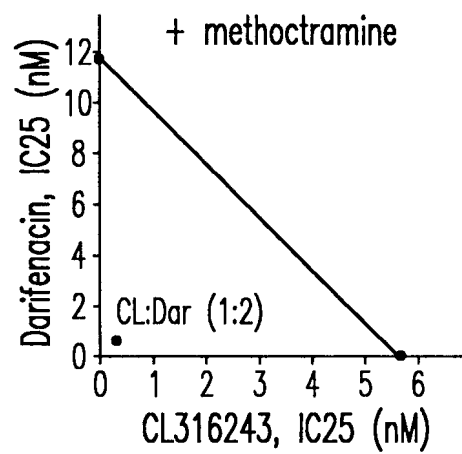


FIG.5B

Effect of combination ratios on the synergistic effect of the combination therapy.

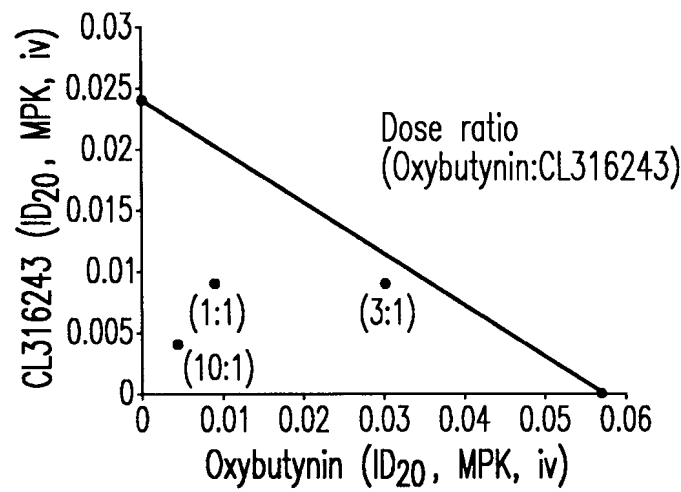


FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/50328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 57/00 (2010.01) USPC - 514/79 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 514/79 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 514/71, 49, 273, 773, 457, 256, 257, 255.01 (text search) Find search terms below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar, Patentscope, SureChem beta 3 adrenergic agonist, beta-adrenergic, modulat\$, stimulat\$, antimuscarinic, hyrdroxymethyl, pyrrolidine, 2-pyrrolidinemethanol, amide, benzamide, overactive bladder, urinary incontinence, tolterodine, oxybutynin, CL316243, methoctramine		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0248979 A1 (BRETTMAN et al.) 09 December 2004 (09.12.2004) para [0017], [0020], [0227]-[0228], [0262], [0272]	12
Y	US 6,291,491 B1 (WEBER et al.) 18 September 2001 (18.09.2001) col 21, ln 25-35; col 12, ln 39-64	1-11, 13-20
Y	US 6,413,984 B1 (PHILIPPO et al.) 02 July 2002 (02.07.2002) col 9-10, Table 1; col 18, ln 63 to col 19, ln 6	1-11, 13-20
Y	OHTAKE et al. 'Pharmacological Characterization of a New Antimuscarinic Agent, Solifenacin Succinate, in Comparison with Other Antimuscarinic Agents', Biol. Pharm. Bull. 2007, Vol 30(1) pages 54-58. pg 56, Table 1, para 2-3; pg 57, Table 2; pg 57, para 1 to pg 58, para 1; pg 58, para 3-4	1-11, 13-20
Y	US 2004/0122014 A1 (MAMMEN et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) para [0009], [0070], [0208]-[0209], [0218], [0259], [0265]	9-11, 14, 18, 20
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 November 2010 (07.11.2010)		Date of mailing of the international search report 18 NOV 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

TÍTULO DE LA INVENCION
TERAPIA DE COMBINACIÓN USANDO UN AGONISTA DEL RECEPTOR
ADRENÉRGICO BETA 3 Y UN AGENTE ANTIMUSCARÍNICO

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La función del tracto urinario inferior es almacenar y liberar periódicamente la orina. Esto requiere la orquestación de los reflejos de la micción y almacenamiento lo cual involucra una variedad de vías neuronales aferentes y eferentes, lo que lleva a la modulación de los mecanismos neuroefectores central y periférico, y la regulación resultante coordinada de los componentes simpático y parasimpático del sistema nervioso autónomo, así como las vías motoras somáticas. Estos regulan de manera proximal el estado contráctil de la vejiga (detrusor) y el músculo liso uretral y el músculo estriado del esfínter uretral.

La hiperreflexia vesical (HV) se caracteriza por los síntomas de urgencia miccional, con o sin incontinencia urinaria de urgencia, por lo general asociada con la frecuencia y nicturia. La prevalencia de hiperreflexia vesical en los Estados Unidos y Europa se ha estimado en 16 a 17% en hombres y mujeres mayores de 18 años. La hiperreflexia vesical es más a menudo clasificada como idiopática, pero también puede ser secundaria a la afección neurológica, la obstrucción del tracto urinario inferior, y otras causas. Desde el punto de vista fisiopatológico, el complejo sintomático de hiperreflexia vesical, especialmente cuando se asocia con la incontinencia de urgencia, es sugestivo de la hiperactividad del detrusor. La urgencia con o sin incontinencia ha demostrado tener un impacto negativo, tanto social como médico, y representa una carga importante en términos de gastos anuales directos e indirectos de atención médica.

Los agentes anti-muscarínicos se han utilizado para el tratamiento de condiciones de incontinencia tales como la HV. Por ejemplo, tolterodina, o (R)-N, N-diisopropil-3-(2-hidroxi-5-metilfenil)-3-fenilpropanamina, ha sido comercializado para el tratamiento de la incontinencia urgente y otros síntomas de la vejiga urinaria inestable o hiperactiva. Tanto la tolterodina como su principal metabolito activo, el derivado 5-hidroximetilo de tolterodina, se cree que contribuyen al efecto terapéutico. Sin embargo, la terapia médica actual para HV con agentes anti-muscarínicos a menudo no es óptima, ya que muchos pacientes, o bien no muestran una respuesta adecuada a los tratamientos actuales, y/o son incapaces de tolerar los efectos secundarios considerables, tales como sequedad en la boca con los tratamientos actuales.

Por lo tanto, existe una continua necesidad de terapias mejoradas que proporcionen un tratamiento más eficaz de la HV y/o efectos secundarios reducidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

5 La figura 1 (fig. 1) es un diagrama que muestra el análisis isobolográfico.

La figura 2 (fig. 2) es un diagrama que muestra los isobologramas de la inhibición de la contracción del detrusor inducida por las combinaciones de CL316243 con tolterodina (A), oxibutinina (B) o darifenacina (C).

10

La figura 3 (fig. 3) es un diagrama que muestra los isobologramas de la inhibición de la contracción del detrusor inducida por las combinaciones del Compuesto 12 y tolterodina (A) y darifenacina (B).

15 La figura 4 (Fig. 4) es un diagrama que muestra CL316243 con o sin pre-tratamiento de metoctramina.

La figura 5 (Fig. 5) es un diagrama que muestra los isobologramas de la inhibición de la contracción del detrusor inducida por las combinaciones de CL316243 y darifenacina con (A) o sin (B) un pretratamiento de metoctramina.

20

La figura 6 (Fig. 6) es un diagrama que muestra los isobologramas de la inhibición de la contracción del detrusor inducida por las combinaciones de CL316243 y oxibutinina en diferentes proporciones.

25

RESUMEN DE LA INVENCION

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que una terapia de combinación con un agonista del receptor adrenérgico beta 3 (en adelante, "agonista β 3-AR"), un agente

antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivo opcional proporciona un efecto sinérgico para el tratamiento de la hiperreflexia vesical. Composiciones de combinación que comprenden un agonista β_3 -AR, un agente antimuscarínico y un antagonista M_2 selectivo opcional también se describen.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se describe en la presente un método para tratamiento de la hiperreflexia vesical, en donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite un agonista β_3 -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivo opcional. Tal terapia de combinación
10 proporciona un efecto sinérgico y por lo tanto mejora la eficacia y/o efectos secundarios reducidos.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que el antagonismo M_2 de un agente antimuscarínico puede jugar un papel importante en la provisión de sinergia para el tratamiento de la HV en una terapia de combinación que comprende un agonista β_3 -AR y el agente antimuscarínico. Sin desear ser limitado por la teoría, se cree generalmente que el antagonismo M_3
15 de un agente antimuscarínico es importante para la eficacia de HV (véase, por ejemplo, Abrams y Andersson. BJU Int., 100, 987 a 1006 (2007)). Ahora se ha encontrado que el antagonismo M_2 , trabajando conjuntamente con el antagonismo M_3 y un agonista β_3 -AR, proporciona la sinergia.

En una realización, un efecto sinérgico se obtiene en una terapia de combinación que comprende un agonista β_3 -AR y un agente antimuscarínico en donde el agente antimuscarínico
20 tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 40. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 20.

Además, en un caso donde un agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de más de 40, la sinergia se puede obtener mediante el uso de un antagonista M_2 adicional selectivo en una terapia de combinación que comprende un agonista β_3 -AR y el agente antimuscarínico.

25 Tal como se usa en la presente, el término "sinergia" o "efecto sinérgico" se utiliza para describir una situación en la que el efecto combinado de dos o más agentes activos es mayor que la suma de los agentes activos individuales. En otras palabras, dos o más agentes activos pueden interactuar de forma que la presencia de un agente activo aumenta o magnifica los efectos del segundo. En contraste, cuando el efecto combinado de dos o más agentes activos
30 sustancialmente es igual a la suma de los agentes activos individuales, el efecto combinado es simplemente aditivo, pero no sinérgico. Y cuando el efecto combinado de dos o más agentes

activos es menor que la suma de los agentes activos individuales, el efecto combinado es sub-aditivo, también no sinérgico.

En una realización, la terapia de combinación comprende administrar a un paciente que lo necesite unagonista β 3-AR y un agente antimuscarínico, donde el agente antimuscarínico
5 tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 40. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 30. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 20. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de aproximadamente 15. En aún en otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de
10 aproximadamente 10. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 1.

En otra realización, el agente antimuscarínico en la terapia de combinación tiene una relación M_2/M_3 mayorde aproximadamente 0.1. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 mayor de aproximadamente 0.5. En otra realización, el agente
15 antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 mayor de aproximadamente 0.8.

En otra realización, el agente antimuscarínico en la terapia de combinación tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 0.1 a 40. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 30. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 20.
20 En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 1 a 20. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 1 a 15. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de 1 a aproximadamente 10.

En una realización, la relación M_2/M_3 se mide utilizando los ensayos de fijación de
25 receptores descritos en Ohtake (Biol. Bull Pharm 30, 54 -. 58,2007), que se incorporanen la presente por referencia en su totalidad. En otra realización, la relación M_2/M_3 se mide utilizando los ensayos descritos en Hegde (Curr Opin Invest Drugs. 5,40-49 (2004), los cuales se incorporanen la presente como referencia en su totalidad.

Las actividades $M_1 - M_4$ de algunos agentes antimuscarínicos de ejemplo reportados
30 en Ohtake (Biol. Pharm. Bull. 30, 54-58 (2007)) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividades M1 -M4 de Algunos Agentes Antimuscarínicos de Ejemplo - Ohtake en la presente.

Agente Antimuscarínico	Ki (nM)				
	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	ProporciónM ₂ /M ₃
Tolterodina	2,7 ± 0,23	4,2 ± 0,51	4,4 ± 0,45	6,6 ± 1,7	1
Oxibutinina	6,1 ± 1,5	21 ± 3,6	3,4 ± 0,65	6,6 ± 2,7	6
Darifenacina	31 ± 2,6	100 ± 14	2,0 ± 0,21	52 ± 15	50
Solifenacina	26 ± 2	170 ± 37	12 ± 4,4	110 ± 45	14
Propiverina	490 ± 110	1400 ± 220	350 ± 53	900 ± 200	4

Hegde (Curr Opin Invertir Drogas 5,40-49 (2004)) describió actividades M₁ - M₄

5 de algunos agentes antimuscarínicos y las actividades M₁ - M₄ de trospio se muestran en la Tabla 2.

Agente Antimuscarínico	Ki (nM)				
	M1	M2	M3	M4	Relación M2/M3
Trospio	0.75	0.65	0.5	1	1

Agentes anti-muscarínicos adecuados para la terapia de combinación incluyen, pero

10 no se limitan a: tolterodina, oxibutinina (incluyendo S-oxibutinina), hiosciamina, propantelina, propiverina, trospio (incluyendo cloruro de trospio), solifenacina, darifenacina, dicyclomina, ipratropio, oxitrol, imidafenacina, fesoterodina, temiverina, SVT-40776, 202405 por GlaxoSmithKline, TD6301, RBX9841, DDP200 y PLD179.

En una realización, el agente anti-muscarínico se selecciona del grupo que consta de: tolterodina, fesoterodina, oxibutinina, solifenacina, propiverina, trospio, imidafenacina, y

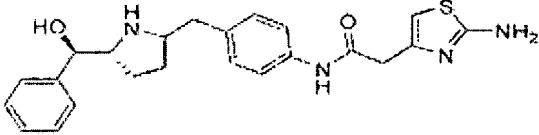
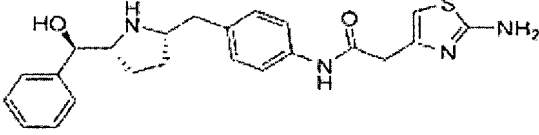
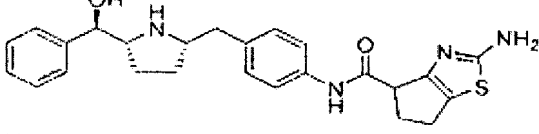
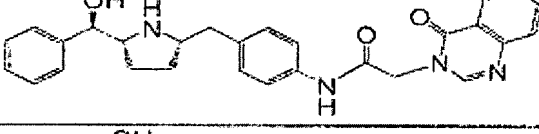
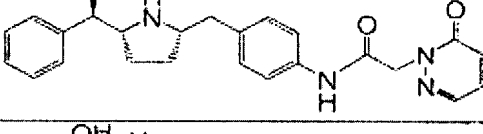
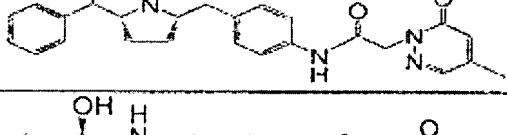
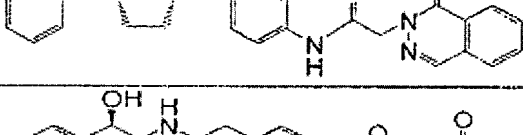
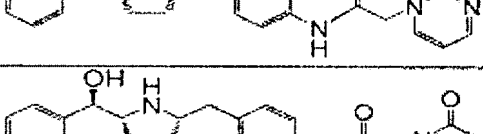
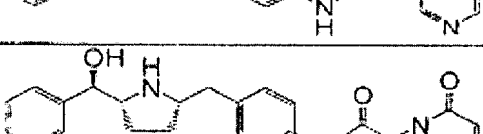
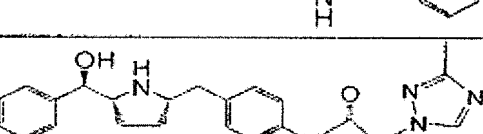
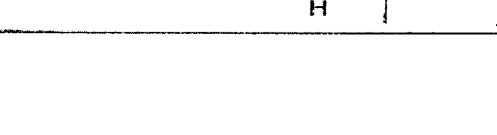
15 TD6301. En una realización, la relación M₂/M₃ del agente anti-muscarínico adecuadoes menor de 40. En otra realización, la relación M₂/M₃ es menor de 30. En otra realización, la relación M₂/M₃ es menor de 20. En otra realización, la relación M₂/M₃ es menor de 15. En una realización, la relación M₂/M₃ se mide utilizando los ensayos de fijación descritos en Ohtake.

En otra realización, el agente anti-muscarínico se selecciona del grupo que consta de: tolterodina, fesoterodina, oxibutinina, solifenacina, propiverina, y trospio.

En otra realización, el agente anti-muscarínico se selecciona del grupo que consta de: tolterodina y oxibutinina.

5 En otra realización, el agente anti-muscarínico es tolterodina. Agonistas β_3 -AR adecuados incluyen, pero no se limitan a, CL316243, y compuestos mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Agonistas β_3 -AR adecuados de la terapia de combinación

# Compuesto	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

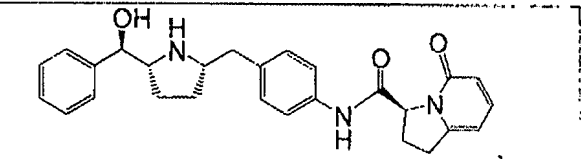
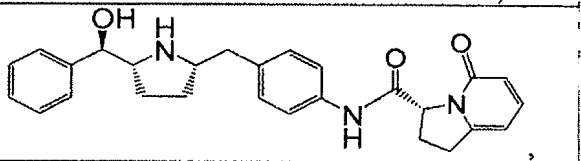
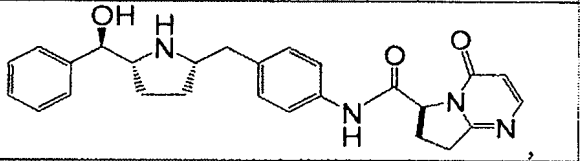
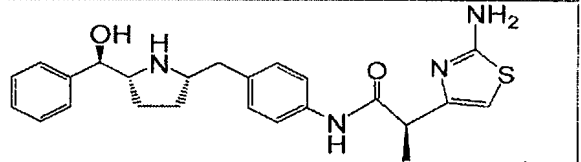
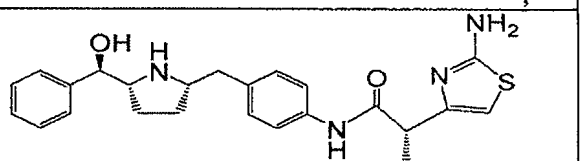
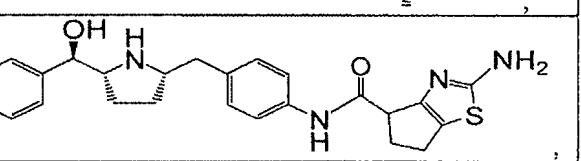
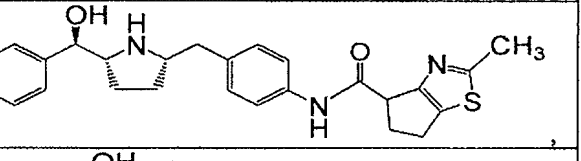
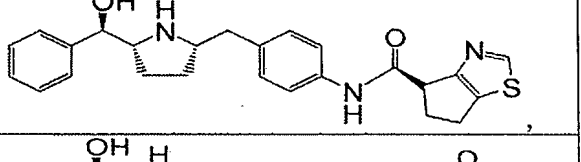
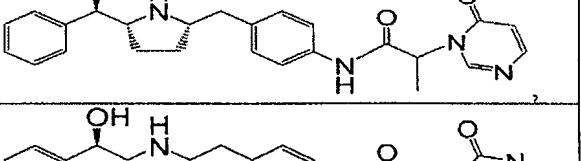
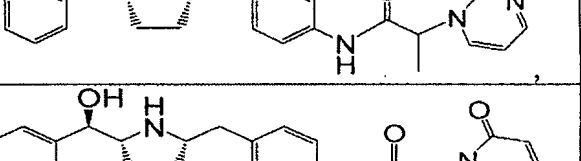
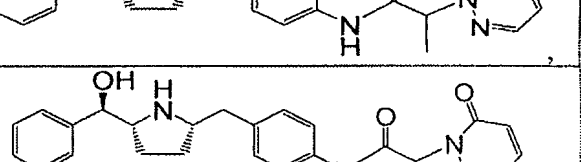
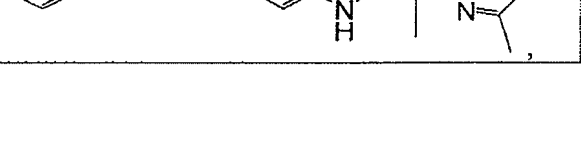
5

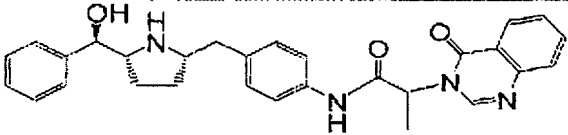
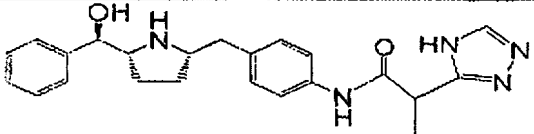
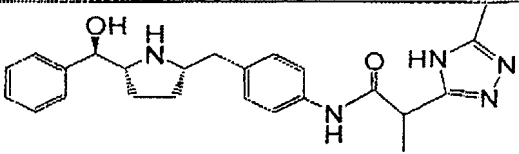
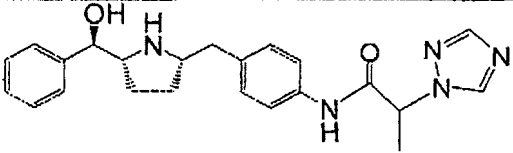
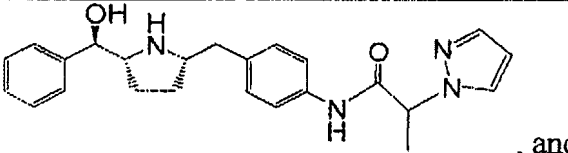
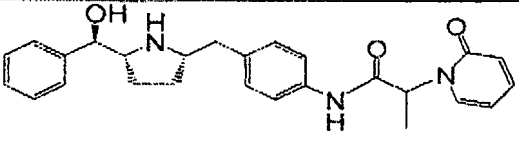
10

15

20

25

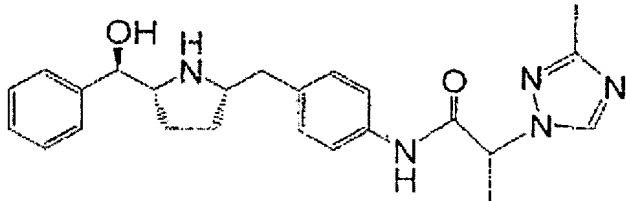
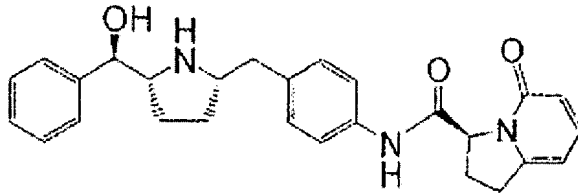
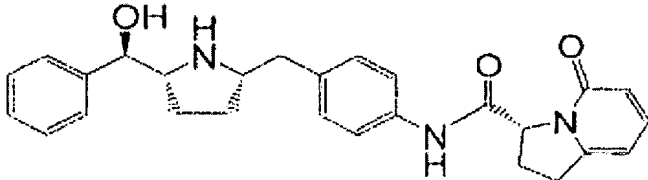
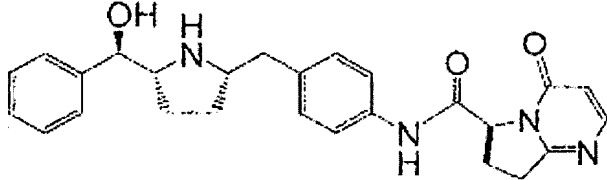
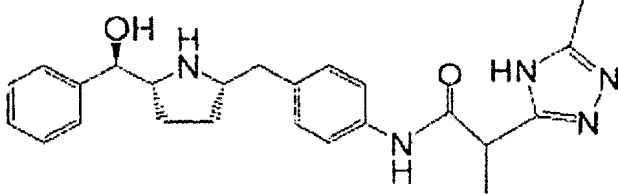
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	

24	
25	
26	
27	
28	
29	

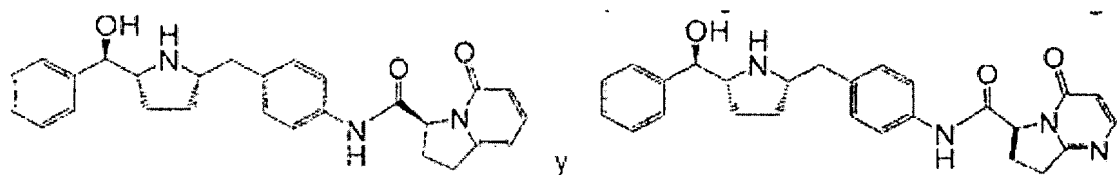
5 En otra realización el agonista β 3-AR se selecciona de los compuestos listados en la Tabla
4:

Tabla 4. Agonistas β 3-AR apropiados para terapia de combinación.

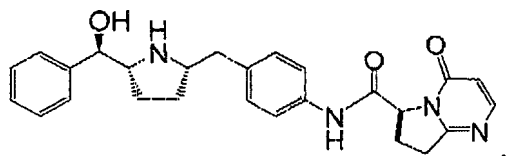
Compuesto No.	Estructura
------------------	------------

11	
12	
13	
14	
26	

En otra realización, el agonista β 3-AR se selecciona del grupo formado por



En aún otra realización, el agonista β 3-AR es



5

Los compuestos de la Tabla 3 se pueden preparar usando procedimientos como se describe a continuación.

A lo largo de la solicitud, los siguientes términos tienen los significados indicados a menos que se indique lo contrario:

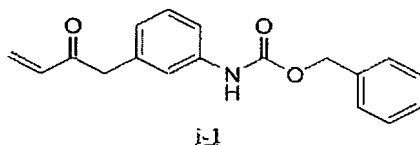
Término	Significado
Ac	Acilo (CH ₃ C (O-)
Aq.	Acuoso
Bn	Bencilo
BOC (Boc)	t-butiloxicarbonilo
BOP	Hexafluorofosfato de Benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino) fosfonio
° C	Grado Celsius
Calc.o Calc	Calculado
Celite	Tierra diatomácea Celite™
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIEA	N,N-diisopropil-etilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida

EDC	1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Eq. o equiv	Equivalente (s)
ES-MS y ESI-MS	Ionización por electrospray en espectroscopía de masas
Et	Etilo
EtOAc	Acetato de etilo
g.	Gramo (s)
H o hr	Hora(s)
HATU	Hexafluorofosfato de O- (7-azabenzotriazol-1-il)-N, N', N',-tetrametiluronio
HOAc	Ácido acético
HOAT	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
LC/MS o LC-MASS	Cromatografía líquida- espectro de masas
L	Litro (s)
M	Molar (s)
Me	Metilo
MeOH	metanol
MF	Fórmula molecular
Min	Minuto (s)
Mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro (s)
Mmol	Milimol (s)
MOZ (MOZ)	p-metoxibenciloxycarbonilo
MP	Punto de fusión
MS	Espectro de masas
nM	Nanomolar
OTf	Trifluorometanosulfonilo
Ph	Fenilo
Prep.	Preparativo

Ref.	Referencia
r.t. o rt	Temperatura ambiente
Sat.	Saturado
SCF CO ₂ S	Dióxido de carbono de Fluido supercrítico
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAI	Yoduro de tetrabutilamonio
TBDPS	Terc-butildifenilsililo
TBS, TBDMS	Terc-butil dimetilsililo
TEA or Et ₃ N	Trietilamina
Tf	Triflato o trifluorometanosulfonato
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Trimetilsililo

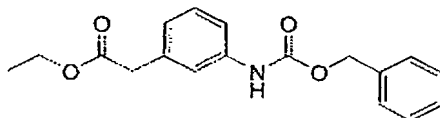
INTERMEDIO 1

[3- (2- oxobut- 3- en- 1- il) fenil] carbamato de bencilo (i- 1):



5

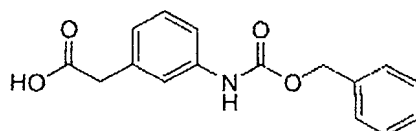
Etapas A: (3- {[(benciloxi) carbonil] amino} acetato de etilo



10 A una solución de (3- aminofenil) acetato de metilo (25 g, 140 mmol) en 250 ml de DCM anhidro se agregó DIEA (28.5 ml, 155 mmol) y la solución resultante se enfrió a 0 °C y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. Luego a esta solución enfriada se agregó cloroformiato de bencilo (21.1 ml, 148 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante la noche permitiendo calentar a temperatura ambiente. La reacción se lavó con HCl 1 M, agua, y después con salmuera. La capa

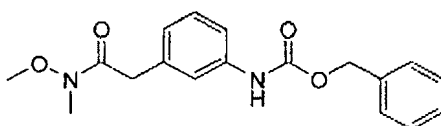
orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. No se necesitó purificación adicional y el material (44 g, 99%) se utilizó como tal para el siguiente paso de la reacción. LC-MS: m / z (ES) 314 (MH)⁺, 336 (MNa)⁺.

5 Etapla B: ácido (3- ([benciloxi] carbonil] amino} fenil) acético



A una solución de 44.0 g (140 mmol) de (3- {[(benciloxi) carbonil] amino} fenil) acetato de etilo (a partir del Paso A) en THF, etanol y agua (1:1:1, 1500 ml) se agregó sólido LiOH (16.8 g, 700 mmol) y la solución resultante se calentó a 60 ° C a través de un baño de aceite durante 3 h. La
10 mezcla se enfrió a temperatura ambiente durante la noche y luego se agregó lentamente 40 ml de HCl concentrado, manteniendo la temperatura por debajo de 25 ° C, hasta que tuvo un pH de 2- 3 aproximadamente. Los extractos orgánicos se extrajeron con acetato de etilo (3 x 750 ml) y luego se combinaron y lavaron con agua y luego con salmuera. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y concentraron al vacío. El compuesto del título (24.7 g, 87%) se utilizó
15 para el siguiente paso de la reacción sin purificación adicional. LC- MS: m / z (ES) 286 (MH)⁺, 308 (MNa)⁺.

Paso C: (3- {2- [metoxi (metil) amino]- 2- oxoetil} fenil) carbamato de bencilo



20 A una suspensión de 24.7 g (87 mmol) de ácido (3- {[(benciloxi) carbonil] amino} fenil) acético en 200 ml de diclorometano (a partir del Paso B) se agregó trietilamina (30.2 ml, 173 mmol) lo cual resultó en ciertos procesos exotérmicos (+5 °C) y la suspensión se convirtió en una solución. Después de 10 minutos de enfriamiento, se agregó HOBt (13.2 g, 87 mmol), HCl de N, O- dimetilhidroxilamina (8.5 g, 87 mmol) a la solución, seguido por EDC (16.6 g, 87 mmol) y la
25 mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución se transfirió a un embudo de separación y se lavó con HCl 1 M, lo cual produjo una emulsión. Se agregó metanol para deshacer la emulsión y la capa acuosa se particionó.

Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. La recristalización del residuo a partir de 1000 ml de hexano al 70% en acetato de etilo (calentado a reflujo y luego enfriado a temperatura ambiente durante la noche) proporcionó el compuesto del título (21 g, 74%) como un sólido blanco. LC- MS: m / z (ES) 329 (MH)⁺.

5

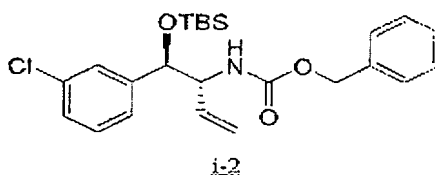
Paso D: bencilo [3- (2- oxobut- 3- en- 1- il) fenil] carbamato de (i- 1)

A una solución de 15 g (45.7 mmol) de bencilo (3- {2- [metoxi (metil) amino]- 2- oxoetil} fenil) carbamato (a partir del paso C) en 1000 ml de THF anhidro en atmósfera de nitrógeno se enfrió a 0 °C a través de un baño de hielo/agua se agregó por goteo mediante una cánula una solución de bromuro de vinil magnesio 1.0 M (100 ml en THF, 100 mmol) y la solución resultante se agitó durante 1 hora a 0 °C. La reacción se apagó por una adición lenta de 500 ml de HCl 1 M manteniendo la temperatura por debajo de 5 °C y se agitó durante 30 min. Luego la mezcla se extrajo con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, seguida de salmuera. Luego los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía *flash* Biotage 75M eluyendo con acetato de etilo al 30% en hexano para rendir el compuesto del título (11 g, 78%) como un sólido amarillo claro. LC- MS: m / z (ES) 310 (MH)⁺, 332 (MNa)⁺. ¹RMN (500 MHz, CDCl₃) 6:7.44- 7.36 (m, 7H), 7.18 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6.70 (br. s, 1H), 6.44 (dd, J = 10.5, 17.6 Hz, 1H), 6.32 (dd, J = 1.1, 17,6 Hz, 1H), 5.85 (dd, J = 1.1, 10.5 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.86 (s, 2H).

20

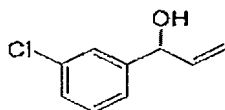
INTERMEDIO 2

((1R)- 1- [(R)- (terc- butilo {(dimetil) silil} oxi) (3- clorofenil) metil] prop- 2- en- 1- il) carbamato (i- 2)



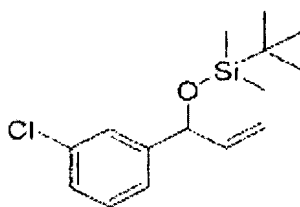
25

Paso A: 1- (3- clorofenil) prop- 2- en- 1- ol



A una solución enfriada de 3- clorobenzaldehído (22.5 g, 160 mmol) en 100 ml de THF anhidro, bajo una atmósfera inerte de nitrógeno se agregó lentamente a través jeringa una solución 1.6 M de cloruro de vinil magnesio en THF (100 ml, 160 mmol) y la solución se agitó durante tres horas permitiendo calentar a temperatura ambiente. La reacción se apagó con una solución saturada de cloruro de amonio y la capa orgánica se separó, se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml), y las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron al vacío. La purificación mediante MPLC Horizon con una columna de gel de sílice de 40M + utilizando un eluyente gradiente de 0- 40% acetato de etilo en hexano proporcionó el compuesto del título (22,4 g, 44%). m/z (ES) 168, 170 (M, M +2) +, 190 192 (MNa, MNa +2)+. ^1RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,38 (s, 1H), 7,357.22 (m, 3H), 5,90 (ddd, J 7,3, 10,0, 17,4 Hz, 1H), 5,38 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 5,18 (d, J- 7.2 Hz, 1H), 5,15 (d, J- 10,1 Hz, 1H), 0,96 (s, 9H), 0,18 (s, 3H), 0,08 (s, 3H).

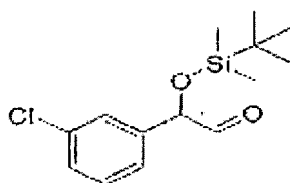
Paso B: {[1- (3- clorofenil) prop- 2- en- 1- il] oxi} dimetilsilano de terc- butilo



A una solución de 22.4 g (133 mmol) de 1- (3- clorofenil) prop- 2- en- 1- ol en 90 mL de DMF anhidra (a partir del paso A) se agregó cloruro de t- butildimetilsililo (20.0 g, 133 mmol) e imidazol (18.1 g, 266 mmol) y la solución resultante se agitó durante la noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se lavó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se separaron, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante columna *flash* de gel de sílice eluyendo con un eluyente de gradiente de 0- 15% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (16.6 g, 46%). m/z (ES) 282, 284 (M, M +2)⁺; 151 153 (M- OTBS, M- OTBS +2)⁺.

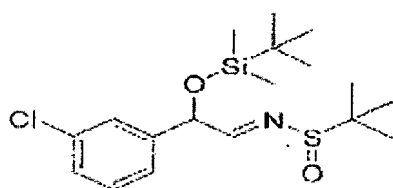
25

Paso C: {[Terc- butilo (dimetil) Silil]oxi} (3- clorofenil) acetaldehído



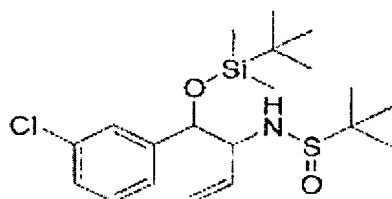
A una solución de 4.0 g (14.2 mmol) de terc- butilo {[1- (3- clorofenil) prop- 2- en- 1- il] oxi} dimetilsilano en diclorometano se enfrió a- 78 ° C a través de hielo seco/acetona (a partir del paso B) Se burbujeó ozono hasta que la solución mantuvo un color azul claro. Luego se burbujeó gas nitrógeno hasta que la solución se tornó clara. Se agregó sulfuro de metilo a la solución y la mezcla resultante se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. El material se concentró al vacío y el residuo se purificó mediante MPLC Horizon con una columna de gel de sílice 40M +, eluyendo con un eluyente de gradiente de 0- 50% de acetato de etilo en hexano para rendir el producto (3.57 g, 89%).

Paso D: N- [(1E)- 2- ([terc- butil(dimetil)silil]oxi- 2- (3- clorofenil)etilideno]- 2- metilpropano- 2- sulfinamida



A una solución de 3.0 g (10.6 mmol) de {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (3- clorofenil) acetaldehído (a partir del paso C) y 1.3 g (10.6 mmol) de (R o S)- 2- metil- 2- propanosulfinamida en 50 ml de diclorometano anhidro se agregó cobre (II) sulfato (3.4 g, 21.2 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 h. La reacción se lavó con agua y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante MPLC Horizon, con una columna de gel de sílice 40M +, eluyendo con un sistema eluyente de gradiente de 0- 25% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (3.26 g, 80%). %. m/z (ES) 387, 390 (M, M+2)⁺.

Paso E: N- {- 1- [{[terc- butil(dimetil)silil]oxi} (3- clorofenil)metil]- prop- 2- en- 1- il} 2- metilpropano- 2- sulfinamida



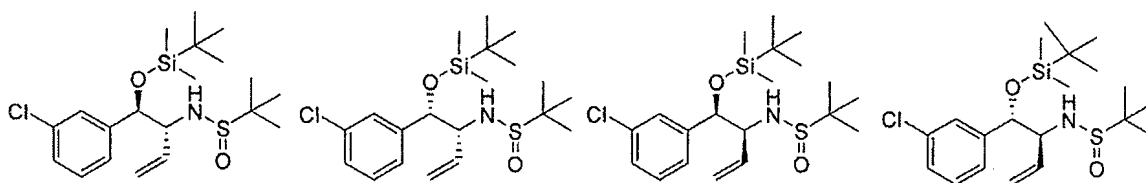
A una solución de 2.4 g (6.20 mmol) de N- [(1E)- 2- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi}- 2- (3- clorofenil) etilideno]- 2- metilpropano- 2- sulfinamida en 20 ml de THF anhidro se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno (a partir del paso D) se agregó una solución 1,6 M de

5 cloruro de vinil magnesio en THF (3.90 ml, 6.2 mmol) mediante una jeringa y la mezcla resultante se agitó durante 1 h. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante una hora adicional. La reacción se apagó con una solución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante MPLC Horizon,

10 con un columna de gel de sílice 40M +, eluyendo con un sistema eluyente de gradiente de 0- 35% acetato de etilo en hexano para rendir los cuatro diastereoisómeros como isómeros individuales.

Por RMN los cuatro productos obtenidos fueron diastereómeros unos de otros. Los isómeros fueron rotulados tan pronto eran eluidos de la columna de gel de sílice. El primer isómero eluido se denominó isómero 1 y, a continuación isómeros 2, 3 y por último isómero 4,

15



Isómero 1: m/z (ES) 416, 418 (M , $M+2$)⁺, 438, 440 (MNa , $MNa+2$)⁺. ^1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.32 (s, 1H), 7.30 (br d, $J = 7.5$, 1H), 7.26 (br d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.22 a 7.18 (m, 1H), 5.60 (ddd, $J = 7.3, 10.3, 17.4$ Hz, 1H), 5.15 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.98- 3.94 (m, 2H), 1.64 (br s, 1H), 1.23 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.08 (s, 3H), - 0.18 (s, 3H).

Isómero 2: m/z (ES) 416 418 (M , $M+2$)⁺, 438 440 (MNa , $MNa+2$)⁺. ^1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.33- 7.31 (m, 2H), 7.26 (br d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 7.20- 7.16 (m, 1H), 5.44 (ddd, $J = 7.2, 10.0, 17.4$ Hz, 1H), 5.26 (superposición d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.25 (superposición d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.84 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.02 (dt, $J = 4.4, 7.8$ Hz, 1H), 3.80 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 1.20 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.14 (s, 3H), - 0.12 (s, 3H).

Isómero 3: m/z (ES) 416 418 (M , $M+2$)⁺, 438 440 (MNa , $MNa+2$)⁺. ^1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.32 a 7.29 (m, 2H), 7.26- 7.24 (m, 2H), 7.22- 7.20 (m, 1H), 6.04 (ddd, $J = 7.1, 10.4, 17.4$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 5.32 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.88- 3.80 (m, 1H), 3.55 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 1.09 (s, 9H), 0.95 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), - 0.10 (s, 3H).

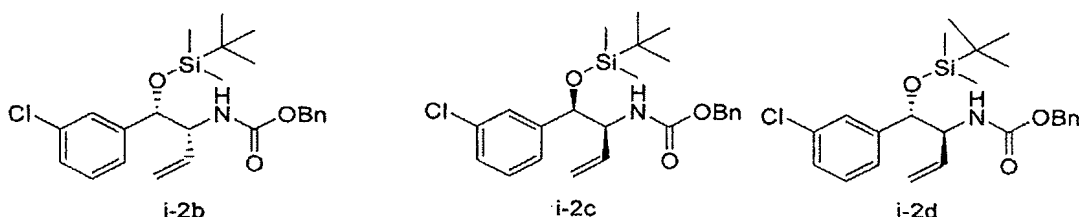
Isómero 4: m/z (ES) 416 418 (M , $M+2$)⁺, 438 440 (MNa , $MNa+2$)⁺. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.32 (s, 1H), 7.30 (br d, $J = 7.5, 1$ H), 7.27 a 7.25 (m, 2H), 7.217.18 (m, 1H), 5.92 (ddd, $J = 7.1, 10.3, 17.4$ Hz, 1H), 5.23 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.75 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 3.88- 3.82 (m, 1H), 3.33 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 1.19 (s, 9H), 0.94 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), - 0.14 (s, 3H).

Paso F: ((1R)- 1- [(R)- {[[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (3- clorofenil) metil] prop- 2- en- 1- il} carbamato (i- 2)

Al isómero 1 (510 mg, 2.22 mmol) de N- {1- {[[terc- butil(dimetil)silil]oxi}(3- clorofenil)metil]- prop- 2- en- 1- il}2- metilpropano- 2- sulfinamida (a partir del paso E) se agregó 5 ml de HCl anhidro 4 M en dioxano y la solución se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se concentró a sequedad y se azeotropicó con tolueno (2 x 5 ml) para eliminar el exceso de HCl. Luego el residuo se absorbió en diclorometano anhidro, se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno, se enfrió a 0 °C con un baño de hielo/agua y luego se agregó lentamente cloroformiato de bencilo (0.32 ml, 2.22 mmol) mediante una jeringa seguido por diisopropiletilamina (1.19 ml, 6.66 mmol) y la solución resultante se agitó durante 2 horas a 0 °C. La solución se concentró a

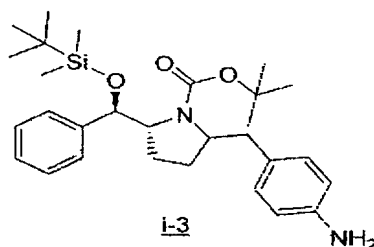
sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante placas preparativas (4 x 1000 uM) eluyendo con 20% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (703 mg, 71%). m/z (ES) 446 448 (M, M +2) +, 468 470 (MNa, MNa +2) +. ¹HRMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,32 (s, 1H), 7,30 (br d, J = 7.5, 1 H), 7.27 a 7.25 (m, 2H), 7.21 a 7.18 (m, 1H), 5,92 (ddd, J- 7.1, 10.3, 17,4 Hz, 1H), 5,23 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,18 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,75 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 3,88- 3,82 (m, 1H), 3,33 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 1,19 (s, 9H), 0,94 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), - 0,14 (s, 3H).

Los intermedios relacionados con aquellos descritos anteriormente de estereoquímica variable se pueden preparar a partir de los materiales de inicio apropiados utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

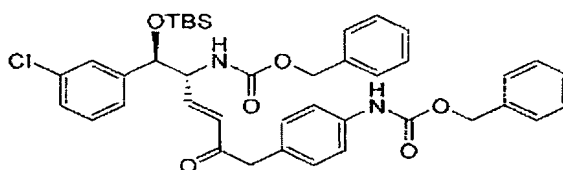


INTERMEDIO 3

(5 R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- ([ter- butil (dimetilsiloloxi})(fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 3)



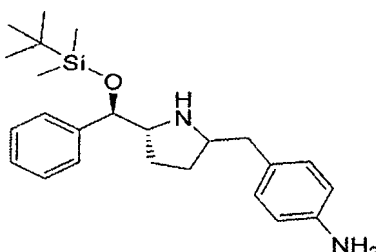
Paso A: {4- [(3AE, 5R, 6R)- 5- {[benciloxi] carbonil] amino- 6- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi}- 6- (3- clorofenil)- 2- oxohex- 3- en- 1- il] fenil} carbamato



A una solución de [3- (2- oxobut- 3- en- 1- il) fenil] carbamato de bencilo (i- 1) (820 mg, 2.80 mmol) y ((1R)- 1- [(R)- { [terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (3- clorofenil) metil] prop- 2- en- 1- il} carbamato (i- 2) (500 mg, 1.12 mmol) en 7 ml de diclorometano anhidro se agregó el catalizador

Zhan I (740 mg, 1.12 mmol) y la solución verde resultante se calentó a 40 °C durante la noche bajo una atmósfera de nitrógeno. La reacción se concentró a sequedad y el residuo se purificó a través de placas preparativas (4 x 1000 uM) eluyendo con 40% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (348 mg, 50%). m/z (ES) 713, 715 (M, M + 2)⁺, 735, 737 (MNa, MNa + 2)⁺.

Paso B: 4- ({(5R)- 5- [(R)- ([terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 2- il} metil) anilina



A una solución de 328 mg (0.46 mmol) de 4- [(3E, 5R, 6R)- 5- {[(benciloxi) carbonil] amino- 6- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi}- 6- (3- clorofenil)- 2- oxohex- 3- en- l- il] fenil} carbamato de bencillo (a partir del paso A) en 25 ml de etanol se agregó paladio al 10% sobre carbón y la suspensión se colocó bajo una atmósfera de hidrógeno a través de un globo de gas de hidrógeno. La reacción se agitó bajo hidrógeno durante 1 hora a temperatura ambiente. TLC indicó que la reacción se completó. El catalizador se filtró utilizando un filtro de jeringa PTFE Gilmen 0.45 µm y se lavó con etanol (4x5 ml). El filtrado se concentró a sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante placa preparativa (3 x 1000 uM) eluyendo con metanol al 5% en diclorometano para rendir el compuesto del título (121 mg, 66%). m/z (ES) 397 (MH)⁺.

Paso C: (5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 3)

A una solución de 121 mg (0.315 mmol) de 4- ({(5R)- 5- [(R)- ([terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 2- il} metil) anilina en 5 ml de THF anhidro (a partir del paso B) se agregó carbonato de terc- butilo (69 mg, 0.315 mmol), seguido por TEA (44 µL, 0.315 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante la noche. La mezcla de reacción se colocó directamente sobre una placa preparativa (1500 µM) y se eluyó con 30% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (100 mg, 64%). m/z (ES) 497 (MH)⁺ 397, (M- Boc) ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.40- 7.30 (m, 5H), 6.75- 6.68 (m,



Paso A: (2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4a) y (2R, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4b)

El intermedio i- 3 (terc- butilo (5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato (Mezcla 4:1 cis y trans) se absorbió en metanol y se purificó a través de SFC Berger Multigram (supercrítico) utilizando un eluyente de metanol al 30%: de dióxido de carbono al 60% para separar los dos diastereoisómeros El primer isómero de la columna se etiquetó isómero menor 1 y el segundo isómero se etiquetó isómero principal 2.

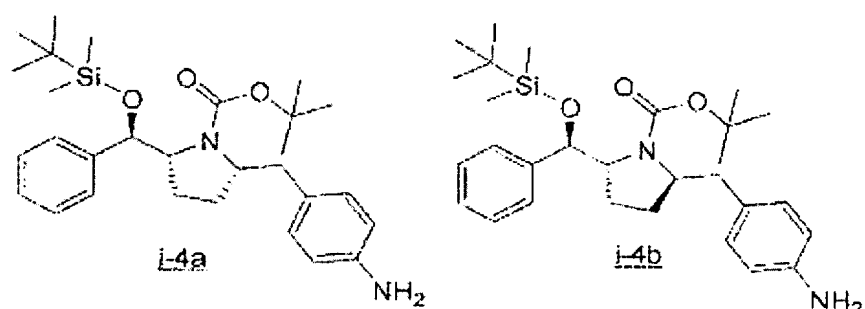
i- 4a: *m/z* (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M- Boc)⁺. ¹ RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,40- 7,30 (m, 5H), 6,75- 6,68 (m, 2H), 6,56- 6,51 (m, 2H), 5,52 a 5,48 (m, 1H), 5,32- 5,28 (m, 1H), 4,16 a 4,6 (m, 2H), 3,88- 3,82 (m, 1H), 3,76- 3,70 (m, 1H), 3,55- 3,48 (m, 2H), 2,74 (br d, J = 11,8 Hz, 1H), 2,44 (br d, J = 11,8 Hz, 1H), 2,05- 1,94 (m, 1H), 1,90- 1,82 (m, 1H), 1,60 (s, 9H), 1,50- 1,42 (m, 1H), 1,32 a 1,22 (m, 2H), 1,10 a 1,2 (m, LH), 0,95 (s, 9H), 0,92 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 0,12 (br d, J = 14,0 Hz, 3H), - 0,04 (s, 3H). Eluido 8.70 minutos en SFC, isómero 2

i- 4b: *m/z* (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M- Boc)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7,40- 7,30 (m, 5H), 6,76 a 6,68 (m, 2H), 6,56- 6,51 (m, 2H), 5,52- 5,48 (m, 1H), 5,32- 5,28 (m, 1H), 4,16- 4,6 (m, 2H), 3,88- 3,82 (m, 1H), 3,76- 3,70 (m, 1H), 3,60- 3,46 (m, 2H), 2,72 (br d, J = 12,0 Hz, 1H), 2,44 (br d, J = 12,2 Hz, 1H), 2,05- 1,94 (m, 1H), 1,90- 1,82 (m, 1H), 1,64 (s, 9H), 1,50- 1,42 (m, 1H), 1,32- 1,22 (m, 2H), 0,10- 0,02 (m, LH), 0,95 (s, 9H), 0,14 (br d, J 13,8 Hz, 3H), 0,09 (s, 3H). Eluido 7.78 minutos en SFC, isómero 1.

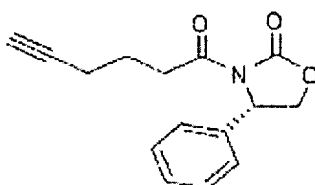
SÍNTESIS DEL INTERMEDIO 4a y EL INTERMEDIO 4b

(2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4a);

(2R, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R) {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4b)



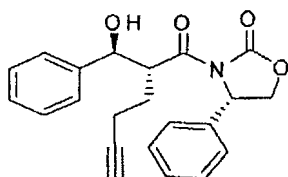
Paso A: (4S)- 3- hex- 5- inoil- 4- fenil- 1 ,3- oxazolidin- 2- ona



A una solución de 69.0 g (615 mmol) de ácido 5- hexinóico y 214 ml (1540 mmol) de trietilamina en 1.0 L de tetrahidrofurano anhidro a- 25 °C bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 83.0 mL (677 mmol) de cloruro de trimetilacetilo durante 20 min. Tras la adición se formó un precipitado blanco y la suspensión resultante se agitó durante 2 h. A continuación, se agregó secuencialmente 28.7 g (677 mmol) de cloruro de litio anhidro y 100.0 g (615.0 mmol) de (4S)- 4- fenil- 1 ,3- oxazolidin- 2- ona y la mezcla se dejó calentar gradualmente a temperatura ambiente durante 12 h. Todos los materiales volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se diluyó con agua (1 L) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (250 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un 5- 50% acetato de etilo en gradiente de hexanos para rendir el compuesto del título como un sólido incoloro (135 g, 85.4%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,40- 7,37 (m, 2H), 7,36- 7,32 (m, 1H), 7,31- 7,28 (m, 2H), 5,42 (dd, J = 8,9, 3,7 Hz, 1H), 4,69 (t, J = 8,9 Hz, 1H), 4,28 (dd, J = 9,2, 3,7 Hz, 1H), 3,13- 3,2 (m, 2H), 2,24 a 2,21 (m, 2H), 1,94 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 1,84 (quinteto, J = 7,1 Hz, 2H). LC- MS: m/z (ES) 258,2 (MH)⁺.

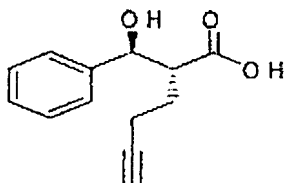
Paso B:

(4S)- 3- {(2R)- 2- [(S)- hidroxi (fenil) metil] hex- 5- inoil}- 4- fenil- 1,3- oxazolidin- 2- ona



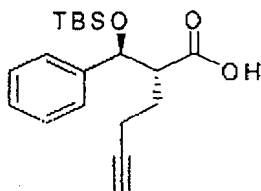
A una solución agitada de 56.8 g (221 mmol) de (4S)-3-hex-5-inoil-4-fenil-1,3-oxazolidin-2-ona a partir del paso A anterior en 265 ml de acetato de etilo anhidro a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 6.31 g (66.2 mmol) de cloruro de magnesio anhidro, 61.5 ml (442 mmol) de trietilamina, 26.9 mL (265 mmol) de benzaldehído y 42.3 ml (331 mmol) de clorotrimetilsilano y la mezcla resultante se agitó durante 72 horas. La mezcla de reacción heterogénea se filtró a través de un tapón de gel de sílice de 300 mL eluyendo con un 1L de acetato de etilo adicional. El filtrado se evaporó a sequedad al vacío y el residuo se suspendió en 265 ml de metanol y 10 mL de ácido trifluoroacético. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 5 horas, tiempo durante el cual la reacción se volvió homogénea. Todos los materiales volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con un 5- 15% acetato de etilo en gradiente de hexanos para rendir el compuesto del título como un sólido blanco (65.0 g, 81.2%). ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 7.30- 7.28 (m, 8H), 07.09- 07.07 (m, 2H), 5.42 (dd, $J = 8.7, 3.7$ Hz, 1H), 4.76- 4.72 (m, 1H), 4.724.67 (m, 1H), 4.65 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 8.7, 3.7$ Hz, 1H), 3.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 2.24 (td, $J = 7.1, 2.5$ Hz, 2H), 2.00- 1.93 (m, 2H), 1.67- 1.61 (m, 1H). LC- MS: m/z (ES) 346,1 (MH- H_2O) +, 386,0 (MNa) +.

Paso C: Ácido (2R)- 2- [(5)- hidroxil (fenil) metil] hex- 5- inóico



A una solución agitada de 65.0 g (179 mmol) de (4S)- 3- {(2R)- 2- [(S)- hidroxí (fenil)]metil} hex- 5- inoil}- 4- fenil- 13- oxazolidin- 2- ona del paso B anterior en 1050 ml de una mezcla 20 a1 de tetrahidrofuran anhidro a agua a 0 ° C bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 77.0 ml (894 mmol) de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 35% a una tasa suficientemente lenta para mantener la temperatura interna por debajo de 3 °C. A continuación, se agregó 395 mL(395 mmol) de una solución acuosa de 1.0 M de hidróxido de litio a una tasa suficientemente lenta para mantener la temperatura interna de la reacción por debajo de 5 °C y la mezcla resultante se agitó durante 3 horas a 0 °C. La reacción se apagó con 755 mL (984 mmol) de una solución acuosa 1.3 M de sulfito de sodio a una velocidad suficientemente lenta para mantener la temperatura interna de la mezcla por debajo de 5 ° C. Todas los materias volátiles se separaron al vacío y la fase acuosa restante se extrajo con acetato de etilo (3 x 200 ml). La fase acuosa se enfrió a 0 °C y se acidificó con una solución acuosa 6 M de cloruro de hidrógeno hasta lograr un pH de 3. Luego la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un 5- 10% acetato de etilo y 3% ácido acético en gradiente de hexanos para rendir el compuesto del título como una goma incolora (32,0 g, 82,0%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7,39- 7,28 (m, 5H), 4,85 (d, J = 8.2,1 H), 3,03- 2,97 (m, 1 H), 2.29- 2.15 (m, 2H), 1,97 (t, J = 2,5 Hz, 1H), 1,93- 1,82 (m, 1H), 1,62- 1,55 (m, 1H). LC- MS: M/Z (ES) 201,0 (MH- H₂O) +.

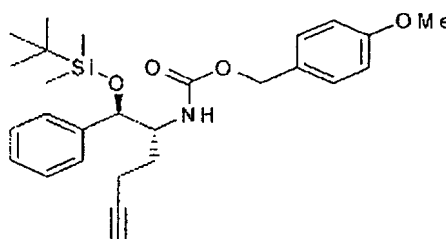
Paso D: Ácido (2R)- 2- [(S)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil} hex- 5- inóico



A una solución agitada de 32.0 g (147 mmol) de (2R)- 2- [(S)- hidroxí (fenil) metil} hex- 5- inóico a partir del paso C anterior de 500 ml de acetonitrilo anhidro a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 77.0 ml (513 mmol) de 1,8- diazabicyclo [5.4.0] undec- 7- eno 22 ml seguido por 66.3 g (440 mmol) de cloruro de terc butildimetilsililo en tres porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas y después se evaporaron al vacío para eliminar todos los materiales volátiles. El residuo se diluyó con 300 ml de diclorometano y

100 ml de agua. Se agregó una solución acuosa 1.0 M de cloruro de hidrógeno a la mezcla hasta que se logró un pH de 3 en la capa acuosa. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (50 ml), salmuera (50 ml) y luego se secaron sobre sulfato de magnesio. Después de la filtración y evaporación al vacío el residuo se disolvió en 350 ml de metanol y se agregó 350 ml (280 mmol) de una solución acuosa 0.8 M de carbonato de potasio. La mezcla resultante se agitó durante 1.5 h, luego se evaporó al vacío para eliminar todos los materiales volátiles. El residuo se diluyó con 300 ml de diclorometano y la fase acuosa se acidificó con una solución acuosa 5.0 M de cloruro de hidrógeno hasta que se logró un pH de 3. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (50 ml), salmuera (50 ml) y luego se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con un acetato de etilo 315% en gradiente de hexanos para rendir el compuesto del título como un sólido incoloro (42.3 g, 86.6%). ¹RMN (500 MHz, CDCl₃): 8.736- 7.27 (m, 5H), 4.78 (d, J = 8.7, 1H), 2.90- 2.86 (m, 1H), 2.19- 2.11 (m, 1H), 2.10- 2.03 (m, 1H), 1.90 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 1.75- 1.67 (m, 1H), 1.41- 1.34 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), - 0.27 (s, 3H). LC- MS: m/z (ES) 333.2 (MH)⁺.

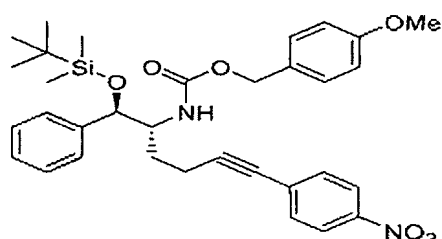
Paso E: 4- metoxibencil {(1R)- 1- {[(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pent- 4- in- 1- il} carbamato



A una solución de 40.0 g (120 mmol) de ácido (2R)- 2- [(S)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] hex- 5- inóico del paso D anterior y 33.5 ml (241 mmol) de trietilamina en 400 ml de tolueno anhidro a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno, luego se agregó 37.5 ml (132 mmol) de difenilfosforilazida. La mezcla se agitó durante 5 horas y luego se agregó 37.5 ml (301 mmol) de alcohol 4- metoxibencilo. La mezcla resultante se calentó hasta 105 °C durante 16 h, se enfrió a temperatura ambiente y después se diluyeron con 250 mL de una solución acuosa saturada de bicarbonato. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (100 ml),

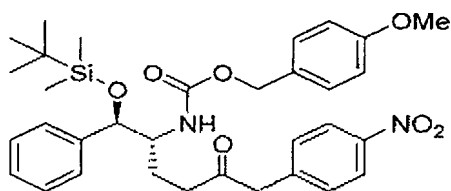
salmuera (100 ml) y luego se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con 3- 10% acetato de etilo en hexanos para rendir el compuesto del título como un aceite incoloro (50.9 g, 90.5%). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.28- 7.21 (m, 7H), 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,92 (s, 2H), 4,77- 4,59 (m, 2H), 3,89- 3,84 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 2.30- 2.22 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,911,85 (m, 1H), 1,57- 1,50 (m, 1H), 0,89 (s, 9H), 0,06 (s, 3H), - 0,15 (s, 3H). LC- MS: m/z (ES) 468,1 (MH)⁺, 490,0 (MNa)⁺.

Paso F: 4- metoxibencilo [(1R)- 1- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrofenil) pent- 4- in- 1- il] carbamato



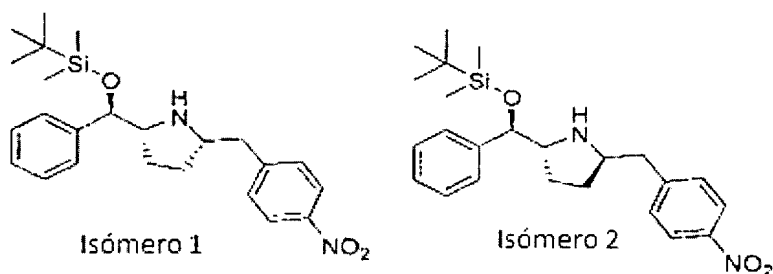
A una solución de acetileno (a partir del paso E, 40 g, 80 mmol) y 4- yodonitrobenceno (21.8 g, 88 mmol) en DMF anhidra (500 ml) se agregó trietilamina (111 mL, 797 mmol). Pd(dppf)Cl₂ (1.95 g, 2.39 mmol) y cobre (I) de yoduro de (910 mg, 4.78 mmol) y la mezcla se degasificó con nitrógeno (burbuja 15 min) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla se vertió en agua (1200 m) y se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml). Luego los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (2 x 500 ml), NaCl saturado (200 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante MPLC (Horizon Biotage 2x flash 65 i) eluyendo con un gradiente de 0- 30% acetato de etilo en hexano para rendir 41 g (84%) como un aceite de color rojo oscuro. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): 08.11- 08.04 (m, 2H), 7,94- 8,01 (m, 1H), 7.38- 7.21 (m, 8H), 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 4,98 (s, 2H), 4,77- 4,59 (m, 2H), 4.00 a 3.95 (m, 3H), 3,81 (s, 3H), 2,56 (t, J = 7,1 Hz, H = 2H), 2,00- 1,95 (m, 1H), 1,66- 1,61 (m, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), - 0,10 (s, 3H). LC- MS: m/z (ES) 589,3 (MH)⁺, 611,2 (MNa)⁺.

Paso G: 4- metoxibencilo [(1R)- 1- [(R)- {[terc butil- (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrofenil)- 4- oxopentil] carbamato



A una solución de acetileno nitrofenilo (a partir del paso F, 41 g, 65.5 mmol) en DMF (40 ml) se agregó pirrolidina (14 ml, 196.5 mmol) y la mezcla resultante se calentó a 80 °C durante 3 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agregó una solución de ácido acético al 10% en agua (110 ml), y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante otras 3 horas. La mezcla se vertió en agua (300 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 250 ml); las capas combinadas de EtOAc se lavaron con agua (2 x 250 ml), con NaCl saturado (100 ml), se secaron sobre MgSO_4 se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó mediante Horizon Flash 75 eluyendo con gradiente incrementándose a partir de 100% en hexanos a 50% EtOAc en hexanos para rendir 34 g (81%) como un aceite de color naranja oscuro. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): 8.17- 8.14 (m, 2H), 7.32- 7.23 (m, 9H), 6.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.96 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.90 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 4.16- 4.13 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.71- 3.77 (m, 2H), 2.65- 2.52 (m, 2H), 1.97- 1.92 (m, 1H), 1.72- 1.60 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.05 (s, 3H), - 0.13 (s, 3H).

Paso H: (2R, 5S)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina (2R, 5S)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil)pirrolidina

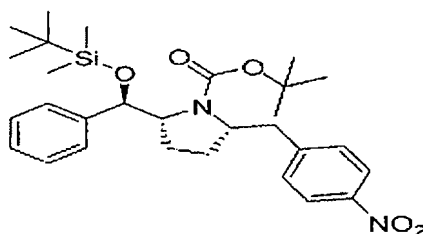


A una solución de cetona amina MOZ protegido (a partir del paso G, 34 g, 56 mmol) en DCM (350 ml) se agregó TFA (256ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. La solución se evaporó al vacío y el residuo se particionó entre DCM- y NaHCO₃ saturado. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ se filtró y se evaporó El residuo se disolvió en MeOH (750 ml) y se enfrió a 0 °C a través de un baño de hielo/agua. Luego se agregó cianoborohidruro de sodio (21.2 g, 337 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante la noche para permitir calentar a temperatura ambiente. La mezcla se apagó por adición de agua y los extractos orgánicos se eliminaron al vacío. Luego la capa acuosa se extrajo con EtOAc (x2) y las capas combinadas de EtOAc se lavaron con NaCl saturado, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (eluyente: gradiente creciente de hexanos 100% a 35% EtOAc en hexanos) para rendir 16.4 g (63.4%) del isómero primero, (2R, 5S)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina, y 3.1 g (12%) del isómero segundo (2R, 5R)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitro) pirrolidina.

Isómero 1: LC- MS: m/z (ES) 427.3 (MH)⁺

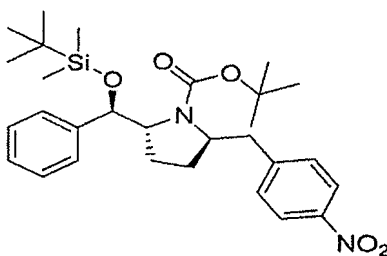
Isómero 2: LC- MS: m/z (ES) 427.3 (MH)⁺

Paso I: (2R, 5S)- 2- I (R)- {[terc- butil(dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo



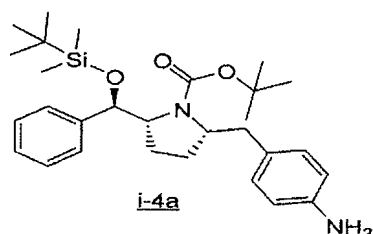
A una solución de (2R, 5S)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4-nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo (12 g, 42.5 mmol) en THF anhidro se agregó anhídrido Boc (9.3 g, 42.5 mmol) seguido por TEA (17.76 ml, 127.4 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 h. La mezcla se lavó con agua (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante MPLC Horizon Biotage (columna de gel de sílice 65i) eluyendo con un gradiente de 20- 75% acetato de etilo en hexano para proporcionar el producto deseado. LC- MS: m/z (ES) 527.3 (MH)⁺, 549.2 (MNa)⁺.

Paso J: (2R, 5R)- 2- [(R) {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo



Se preparó de la misma manera como el Paso I, pero reemplazando el isómero pirrolidina cis por el isómero trans, (2R, 5R)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (nitrobencil) pirrolidina. LC- MS: m/z (ES) 527.3 (MH)⁺, 549.2 (MNa)⁺.

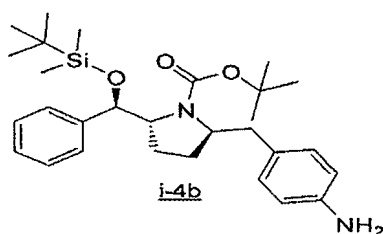
Paso K: (2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4a);



Un matraz con agitador Parr de 500 ml se cargó con 10% Pd/C (4.75 g) y a éste se agregó 100 ml de metanol para cubrir el catalizador. Una solución del intermedio nitro a partir del paso I (8.5 g, 18.5 mmol) en metanol (80 ml) se agregó luego a la suspensión, seguido por 15.4 ml de cloruro de hidrógeno 1.0 M en solución de metanol. El recipiente de reacción se colocó bajo gas de hidrógeno a 50 PSI y la mezcla se agitó durante la noche. Una alícuota fue tomada y analizada a través de LC- MS, lo cual mostró una reacción completa.

El catalizador se separó por filtración utilizando Celite y se lavó con metanol (2 x 100 ml). El filtrado se concentró a sequedad y el producto se purificó mediante MPLC Horizon (65i columna de sílice) eluyendo con gradiente incrementándose a partir de 0% a 30% de acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (6.2 g, 72%). m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M-Boc)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.38- 7.29 (m, 5H), 6.76- 6.68 (m, 2H), 6.55- 6.50 (m, 2H), 5.52- 5.49 (m, 1H), 5.30- 5.27 (m, 1H), 4.15- 4.5 (m, 2H), 3.86- 3.81 (m, 1H), 3.76- 3.71 (m, 1H), 3.55- 3.47 (m, 2H), 2.74 (br d, J = 11.7 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 11.7 Hz, 1H), 2.05- 1.93 (m, 1H), 1.90- 1.83 (m, 1H), 1.60 (s, 9H), 1.50- 1.42 (m, 1H), 1.31- 1.21 (m, 2H), 1.10- 1.2 (m, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.92 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 0.13 (br d, J 14.0 Hz, 3H), - 0.05 (s, 3H)

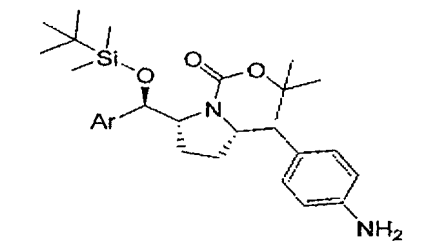
Paso L: (2R, 2R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4b)



Se preparó de la misma manera como el Paso K, pero reemplazando el isómero pirrolidina cis por el isómero trans, (2R, 5R)- 2- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo. m/z (ES) 497 (MH)⁺, 397 (M- Boc)⁺. ¹H

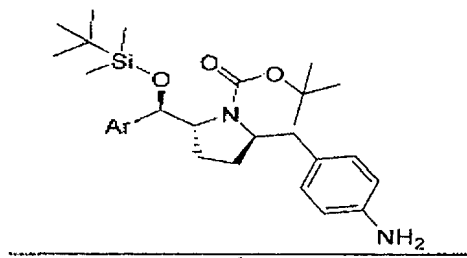
RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.41- 7.30 (m, 5H), 6.73- 6.67 (m, 2H), 6.56- 6.50 (m, 2H), 5.52- 5.48 (m, 1H), 5.33- 5.28 (m, 1H), 4.15- 4.6 (m, 2H), 3.86- 3.81 (m, 1H), 3.76- 3.70 (m, 1H), 3.59- 3.46 (m, 2H), 2.72 (br d, J 12,0 Hz, 1H), 2.44 (br d, J = 12,0 Hz, 1H), 2.05- 1.93 (m, 1H), 1.90- 1.82 (m, 1H), 1.64 (s, 9H), 1.49- 1.42 (m, 1H), 1.32- 1.20 (m, 2H), 1.10 a 1.2 (m, LH), 0.95 (s, 9H), 0.14 (br d, J 13,7 Hz, 3H), 0.10 (s, 3H).

Los siguientes intermedios se prepararon a partir de los materiales de inicio apropiados según los procedimientos descritos anteriormente para el intermedio i- 4a.



Intermedio	Ar	Calc. Masa	EM (E / Z) (MH)+
i- 4c		514.30	515.30
i- 4d		514.30	515.30
i- 4e		532.30	533.30
I- 4f		532.30	533.30

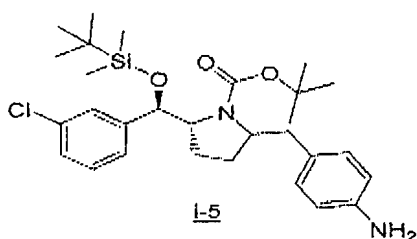
Los siguientes intermedios se prepararon a partir de los materiales de inicio apropiados según los procedimientos descritos anteriormente para el intermedio i- 4b.



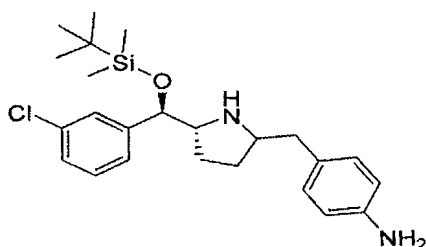
Intermedio	Ar	Calc. Masa	EM (E / Z) (MH)+
i- 4g		514.30	515.30
i- 4h		514.30	515.30

INTERMEDIO 5

(5 R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (3- clorofenilmetil) pirrolidina- 1- carboxilato (1- 5)



Paso A: 4- ({(5R)- 5- [(R)- {[ter- butil (dimetil) silil] oxi} (3- clorofenil) metil] pirrolidin- il} metil) anilina



A una solución de 100 mg (0.15 mmol) de bencilo {4- [(3E, 5R , 6R)- 5- {[(benciloxi) carbonil] amino- 6- {[terc- butil (dimetil) silil] oxi }- 6- (3- clorofenil)- 2- oxohex- 3- en- 1- il] fenil} carbamato de bencilo (a partir del paso A, i- 3) en 8 ml de acetato de etilo se agregó paladio

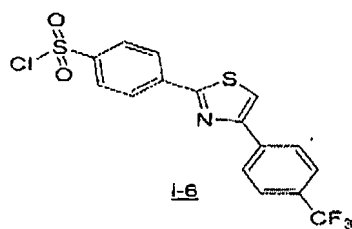
al 10% sobre carbón y la suspensión se colocó bajo una atmósfera de hidrógeno a través de un globo de gas de hidrógeno. La reacción se agitó bajo hidrógeno durante 8 horas a temperatura ambiente. El catalizador se separó por filtración utilizando un filtro de jeringa Gilmen 0.45 μ M PTFE y se lavó con acetato de etilo (4x2 ml). El filtrado se concentró a sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante una placa preparativa (1000 μ M) eluyendo con metanol al 5% en diclorometano para rendir el compuesto del título (33 mg, 51%). m/z (ES) 430, 432 (M, M +2)⁺.

Paso B: (5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R){[terc- butil(dimetil)silil]oxi}(3- clorofenil)metil]pirrolidina-carboxilato (I- 5)

A una solución de 33 mg (0.07 mmol) de 4- ((5R)- 5- [(R)- ([terc- butil(dimetil)silil]oxi}(3- clorofenil)metil]pirrolidin- 2- il}metil)anilina en 1 ml de THF anhidro (a partir del paso A) Se agregó carbonato de terc- butilo (15.3 mg, 0.07 mmol), seguido por TEA (13 μ L, 0.07 mmol) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante la noche. La mezcla de reacción se colocó directamente sobre una placa preparativa (500 μ M) y se eluyó con 30% acetato de etilo en hexano para rendir el compuesto del título (25 mg, 78%). m/z (ES) 530, 532 (M, M +2)⁺, 430, 432 (M- Boc, H- Boc +2)⁺.

INTERMEDIO 6

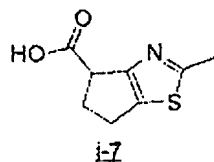
cloruro de 4- {4- [4- (trifluorometil) fenil]- 1,3- tiazol- 2- il} bencenosulfonilo (i- 6)



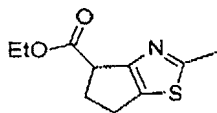
El Intermedio 6 puede prepararse según los procedimientos publicados, por ejemplo, Ikemoto, Tetrahedron 2003,59,1317- 1325.

INTERMEDIO 7

Ácido 2- metil- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 7)



Paso A: 2- metil- 5 ,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo



A una solución de 2- oxociclopentano- 2- carboxilato de etilo (56 g, 359 mmol) en cloroformo (500 ml) enfriada a 0 °C se agregó bromo (18.5 ml, 359 mmol) durante ~ 20 minutos. Después de completar la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El gas de nitrógeno se burbujeó a través de la mezcla durante 90 minutos para eliminar la mayor parte de HBr. Se lavó con agua (500 mL), con NaHCO₃ (250 ml), NaCl saturado (200 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo disolvió en EtOH (500 ml) y tioacetamida (26.9 g 359 mmol), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, luego a reflujo durante la noche. La mezcla se enfrió y se evaporó, y el residuo se particionó entre DCM y NaHCO₃ saturado, la capa orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante MPLC (Biotage Horizon: 2 x FLASH 65i) eluyente: hexanos 100% (450 ml), gradiente incrementándose desde 100% en hexanos al 25%, EtOAc en hexanos (1400 ml), luego EtOAc al 25% en hexanos para rendir el compuesto del título (32 g, 42%) como un aceite oscuro. ¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) 8: 4,22 (q, J- 7.0 Hz, 2H), 3,96 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 2,70 (s, 3H), 1,30 (t, J- 7,0 Hz, 3H).

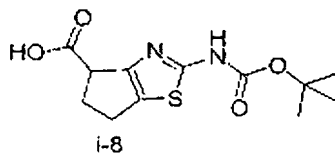
Pasos B: Ácido 2- metil- 5, 6 dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 7)

A una solución de 31.5 g (149 mmol) 2- metil- 5 ,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo en THF (450 ml) y metanol (100 ml) (a partir del paso A) se agregó una solución de hidróxido de litio (149 ml de una solución 1M, 149 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Los extractos orgánicos se eliminaron por evaporación y el residuo acuoso se extrajo con ET₂O (2 x 250 ml) y se acidificó a pH 3 mediante la adición de 1 M HCl (~170 ml) y se saturó con NaCl sólido. Se extrajo con DCM (3 x 250 ml), las capas DCM se combinaron se secaron sobre MgSO₄ se filtraron y evaporaron. Se extrajeron con DCM (3 x 250 ml), las capas combinadas DCM sesecaron sobre MgSO₄ se filtraron y se

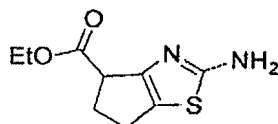
evaporaron. El residuo se trituró con acetronitrilo, se filtró y se secó para rendir el compuesto del título (7.1 g, 26%) como un sólido blancuzco. $^1\text{HRMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 11,75 (br s, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 2,90- 2,66 (m, 6H).

INTERMEDIO 8

Ácido 2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta $[\alpha]$ [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 8)

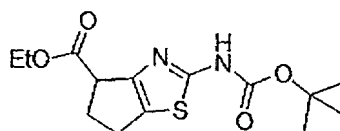


Paso A: 2- amino- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta $[\alpha]$ [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo



Se preparó de la misma manera que el intermedio (i- 7) reemplazando la tioacetamida en el Paso A por tiourea. $^1\text{HRMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 5,30 (br s, 2H), 4,21 (q, $J = 7.0, 2$ H), 3,81 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 2,66 (m, 2H), 1,30 (t, $J = 7.0$, 3H).

Paso B: 2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta $[\alpha]$ [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo



A una solución de 230 mg (1.08 mmol) de 2- amino- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta $[\alpha]$ [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo en diclorometano (5 ml) (a partir del paso A) se agregó di-terc- butildicarbonato (236 mg, 1.08 mmol), trietilamina (0.15 ml, 1.08 mmol) y DMAP (13 mg, 0.11 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se lavó con HCl 1N (10 ml), NaCl saturado (5 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó.

El residuo se purificó mediante MPLC (Horizon Biotage: FLASH 25 + S) eluyente: 100 Hexanos% (100 ml), EtOAc gradiente 0- 15% en hexanos (900 ml) y luego EtOAc 15% en hexanos (500 ml) para rendir el compuesto del título (160 mg, 47%) como una espuma blanca. $^1\text{HRMN}$

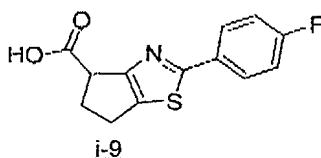
(500 MHz, CDCl_3) δ : 9,23 (br s, 1H), 4,17 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,95 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,86 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 1,55

Paso C: Ácido 2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 8)

Se preparó a partir de 2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxilato de etilo (del paso B) utilizando un procedimiento análogo al que se encuentra en el intermedio (i- 7) el paso B. $^1\text{HRMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 3,96 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 2,88 (m, 2H), 2,71 (m, 1H), 1,55 (s, 9H).

INTERMEDIO 9

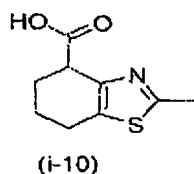
Ácido 2- (4- fluorofenil- 5 ,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 9)



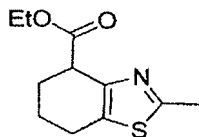
Se preparó utilizando procedimientos análogos a aquellos empleados en el intermedio 7 (i- 7) reemplazando tioacetamida por 4- fluorotiobenzamida en el paso A. $^1\text{HRMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 7,90 (m, 2H), 7,29 (t, $J = 8,7$, 2H), 3,81 (m, 1H), 2,99 (m, 1H), 2,86 (m, 1H), 2,70- 2,58 (m, 2H).

INTERMEDIO 10

Ácido 2- metil- 4 ,5,6,7- tetrahidro- 1 ,3- benzotiazol- 4- carboxílico (I- 10)



Paso A: 2- metil- 4 ,5,6,7- tetrahidro- 1 ,3- benzotiazol- 4- carboxilato de etilo



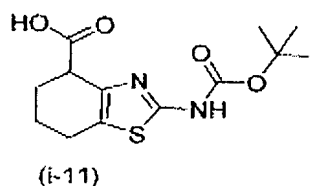
A una solución de 2- oxociclohexanocarboxilato de etilo (15 g, 88 mmol) en éter dietílico anhidro (40 ml) enfriada a 0 °C se agregó bromo (4.5 ml, 88 mmol) por goteo durante 15 minutos. Después de completar la adición la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante 90 min. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con NaHCO₃, saturado. NaCl, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se absorbió en etanol (100mL) y tioacetamida (6,6 g, 88 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, luego se sometió a reflujo durante la noche. La mezcla se evaporó y el residuo se particionó entre NaHCO₃ saturado y DCM. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante MPLC (Biotage Horizon: FLASH 65i) eluyente: 100 Hexanos% (500 ml), gradiente- 0 a 25% EtOAc en hexanos (1200 ml) después EtOAc 25% en hexanos (1200 ml) para rendir el compuesto del título (6.14 g, 31%) como un aceite de color naranja pálido . ¹HRMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 4,22 (q, J = 7,1, 2H), 3,84 (t, J = 5.5, 1 H), 2,80 (m, 1H), 2,73 (m, 1H), 2,65 (s, 3H), 2,18 (m, 1H), 2,11- 1.95 (m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,29 (t, J- 7,1, 3H).

Paso B: ácido 2- metil- 4 ,5,6,7- tetrahidro- 1 ,3- benzotiazol- 4- carboxílico (i- 10)

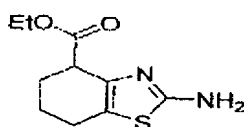
Se preparó a partir de 2- metil- 4 ,5,6,7- tetrahidro- 1 ,3- benzotiazol- 4- carboxilato de etilo (a partir del paso A) de acuerdo con el procedimiento descrito en el intermedio (i- 7) el paso B. ¹HRMN (500 MHz , CDCl₃) δ: 9,26 (br s, 1H), 3,81 (q, J = 7,3 y 5,9, 1H), 2,75 (m, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,24 (m, 1H), 2.18- 2.01 (m, 2H), 1,82 (m, 1H).

INTERMEDIO 11

Ácido 2- [(terc- butoxicarbonil) amino] 4,5,6,7- tetrahidro- 1 ,3- benzotiazol- 4- carboxílico (I- 11)



Paso A: 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,3-benzotiazol-4-carboxilato de etilo



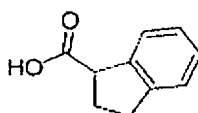
Se preparó según los procedimientos descritos en el intermedio 10 (i- 10) reemplazando tioacetamida por tiourea en el paso A. ¹HRMN (500 MHz, DMSO- d₆) δ: 9,28 (br s, 2H), 4,11 (q, J = 7,3, 2H), 3,71 (t, J= 5,0, 1H), 2,57- 2,39 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,78 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,17 (t, J = 7,3, 3H).

Paso B: Ácido 2- [(terc- butoxicarbonil)amino]- 4,5,6,7- tetrahydro- 1,3- benzotiazol- 4- carboxílico (i- 11)

Se preparó a partir de 2- amino- 4,5,6,7- tetrahydro- 1,3- benzotiazol- 4- carboxilato de etilo (a partir del paso A) de acuerdo con los procedimientos descritos en el intermedio 8 (i- 8) los pasos B y C. ¹HRMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 3,70 (t, J = 5,2, 1H), 2,74 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,25 (m, 1H), 2,10 a 1,94 (m, 2H), 1,87 (m, 1H), 1,55 (s, 9H).

INTERMEDIO 12

Ácido indan- 1- carboxílico (i- 12)

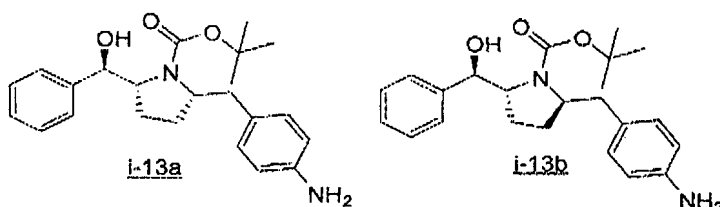


Se preparó según con el procedimiento de la literatura (*Journal of Organic Chemistry*) (2000), 65 (4), 1132- 1138.

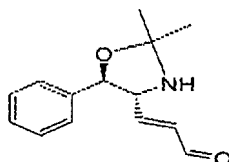
INTERMEDIO 13a e INTERMEDIO 13b

(2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (I- 13 a);

(2R, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (I- 13 b)

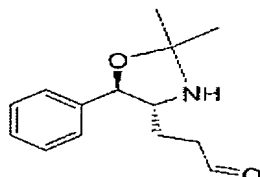


Paso A: (4R, 5R)- 2, 2- dimetil- 4- (1 E)- 3- oxoprop- 1- en- 1- il]- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3 – carboxilato de terc- butilo



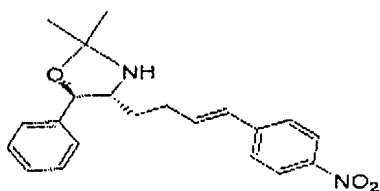
A una solución de (4S, 5R)- 4- formil- 2 ,2- dimetil- 5- fenil- 1 ,3- oxazolidina- 3- carboxilato de terc- butilo (20.9, 89.1 mmol) en CH_2Cl_2 (150 ml) se agregó (trifenilfosforanilideno) acetaldehído (27,1 g 89.1 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 h. Después de la eliminación de 1/3 del disolvente, se agregó generosamente hexanos y el sólido resultante se separó por filtración. La cromatografía *flash* sobre un Biotage horizon ® (gel de sílice, 0 a 20% acetato de etilo en gradiente de hexanos, luego acetato de etilo al 20% en hexanos) proporcionó 16.3 g (72%) del compuesto del título como un aceite amarillo. LC/MS 354.3 (M +23).

Paso B: (4R, 5R)- 2,2- dimetil- 4- (3- oxopropil)- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3- carboxilato de terc- butilo



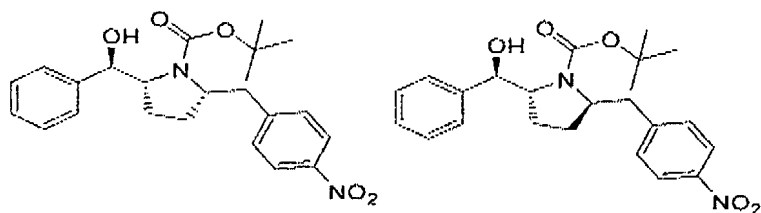
A una solución de (4R, 5R)- 2,2- dimetil- 4- [(1E)- 3- oxoprop- 1- en- 1- il]- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3 –carboxilato de terc- butilo (19.6 g, 59.1 mmol) (a partir del paso A) en acetona (150 mL) se agregó 1.9 g de 10% Pd/C y la suspensión resultante se agitó bajo un globo de hidrógeno a temperatura ambiente durante 24 h. El sólido se filtró sobre Celite y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía *flash* sobre un sistema Biotage Horizon ® (gel de sílice, gradiente 0 a 20% acetato de etilo en hexanos luego acetato de etilo al 20% en hexanos) para rendir 11.5 g (58%) del compuesto del título como un aceite incoloro. LC /MS 356.3 (M+23).

Paso C: (4R, 5R)- 2, 2- dimetil- 4- [(3E)- 4- (4- nitrofenil) but- 3- en- 1- il]- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3- carboxilato de terc- butilo y- (4R, 5R)- 2, 2- dimetil- 4- [(3Z)- 4- (4- nitrofenil) but- 3- en- 1- il]- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3- carboxilato de terc- butilo



A una solución de (4R, 5R)- 2,2- dimetil- 4- (3- oxopropil)- 5- fenil- 1, 3- oxazolidina- 3- carboxilato de terc- butilo (10.0 g, 30.0 mmol) a partir del paso B en CH₂Cl₂ (200 ml) se agregó (4-nitrobencil) trifenil- fosfonio (21.5 g, 45.0 mmol) seguido por Et₃N (8.36 ml, 60.0 mmol). La mezcla de reacción roja se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Se vertió hexano (200 ml) en la mezcla de reacción y el sólido se separó por filtración. La cromatografía *flash* sobre un sistema Biotage Horizon ® (gel de sílice, gradiente 0 a 10% acetato de etilo en hexanos, luego acetato de etilo al 10% en hexanos) proporcionó 10.7 g (79%) de los compuestos del título (mezcla cis trans) como una espuma de color amarillo pálido. LC/MS 475.4 (M +23).

Paso D: (2R, 5S)- 2- [(R)- hidroxí (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo y- (2R, 5R)- 2- : [(R)- hidroxifenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de terc butilo



A una solución de la mezcla cis/trans anterior (7.86 g, 17.4 mmol) a partir del paso C en acetato de etilo (100 mL) se agregó 50 ml de solución HCl 2N y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se calentó a 45 ° C durante 3 h. Los materiales volátiles se eliminaron bajo presión reducida. El sólido blanco resultante se disolvió en N, N- dimetilformamida (100 ml) y se agregó 15.1 ml (86.7 mmol) de $t\text{Pr}_2$ puro. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 h. Luego se agregó Di- terc- butilo (4.55 g, 20.8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (200 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 ; se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía *flash* sobre un sistema horizonte Biotage® (gel de sílice, de 0 a 30% acetato de etilo en gradiente de hexanos) para rendir 1.61 g (22%) de los compuestos del título (2R, 5S)- 2- [(R)- hidroxí (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato(cis) de terc- butilo y 3.9 g (54%) de (2R, 5R)- 2- [(R)- hidroxí (fenil) metil]- 5- (4- nitro)- 1- pirrolidina carboxilato- (cis) de terc- butilo. LC /MS 435.4 (M +23).

Paso E: (2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- hidroxí (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 13a)

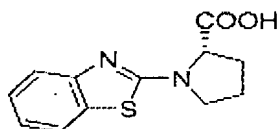
A una solución de la anterior (2R, 5S)- 2- [(R)- hidroxí (fenil) metil]- 5- (4- nitrobencil) pirrolidina- 1- carboxilato de (cis) de terc- butilo (1.51 g, 3.66 mmol) a partir del paso D en etanol (20 ml) se agregó 0.15 g de 10% Pd/C y la suspensión resultante se agitó bajo un globo de hidrógeno a temperatura ambiente durante 5 h. La filtración a través de Celite y la eliminación del disolvente proporcionó 1.40 g (100%) del compuesto del título como espuma blanca que se utilizó sin purificación adicional. LC/MS 405.3 (M 23).

Paso F: (2R, 5R)- (4- aminobencil)- 5- [(R)- hidroxil (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 13b)

A una solución de (2R, 5R)- 2- [(R)- hidroxil (fenil) metil]- 5- (4- nitro) pirrolidina- 1- carboxilato de (trans) de terc- butilo (3.90 g, 9.46 mmol) del paso D en etanol (40 ml) se agregó 0.4 g de 10%Pd/C y la suspensión resultante se agitó bajo un globo de hidrógeno a temperatura ambiente durante 6 h. El sólido se separó por filtración a través de Celite. Después de la eliminación del solvente, la cromatografía *flash* sobre un sistema Biotage horizon® (gel de sílice, acetato de 0 a 30% de etilo en gradiente de hexano a con, 30% acetato de etilo en hexanos) proporcionó 2.30 g (64%) del compuesto del título como una espuma blanca . LC/MS 405.3 (M 23).

INTERMEDIO 14

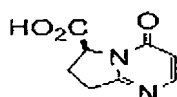
Ácido (2S)- 1- (1 ,3- benzotiazol- 2- il) pirrolidina- 2- carboxílico (i- 14):



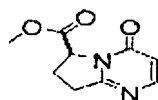
A una solución de 28 mg (0.24 mmol) de L- prolina en N, N- dimetilformamida (3 ml) a temperatura ambiente se agregó 51 mg (0.24 mmol) de 2- bromobenzotiazol, 100 mg (0.72 mmol) de carbonato de potasio, y 6 mg (0.03 mmol) de yoduro de cobre. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante la noche. Después se filtró y se purificó mediante HPLC de fase inversa (TMC Pro- Pac C18; 0- 60% de ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo/ácido trifluoroacético al 0.1% en gradiente de agua). Las fracciones puras se liofilizaron durante la noche para rendir 35 mg de 60% del compuesto del título como un sólido marrón claro ¹H RMN. (DMSO- d₆): δ 7,78 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,45 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,28 (t, J- 7,8 Hz, 1 H), 7,08 (t, J = 7,8 Hz, 1 H), 4,48 (d, J- 7,3 Hz, R H), 3.523.61 (m, 2 H), 2,37 (m, 1 H), 2.1- 2.11 (m, 3 H). LC/MS 249.3 (M + 1)

INTERMEDIO 44

Preparación del ácido [(6S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolo [1,2-] pirimidina- 6- carboxílico (i- 44)

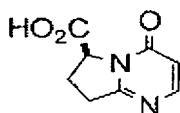


Paso A: [6 (S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolo [1, 2-] pirimidina- 6- carboxilato de metilo



(2S)- 5- metoxi- 3 ,4- dihidro- 2H- pirrol- 2- carboxilato de metilo (4.19 g, 26.6 mmol) y 3- azatriciclo [4.2.1.0.^{2,5}] non- 7- en- 4- ona (2.4 g, 17.8 mmol) se calentó a 110 ° C durante la noche. La purificación mediante un sistema de Horizon Biotage ® (0- 100% acetato de etilo/mezcla hexanos) proporcionó el compuesto del título de [6 (S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolo [1 ,2- α] pirimidina- 6- carboxilato de metilo y el intermedio (7S)- 9- oxo- 3 ,8- diazatetraciclo [9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}] tetradeca- 3 ,12- dieno- 7- carboxilato de metilo. El intermedio se calentó a 150 °C durante 45 minutos para rendir el compuesto del título sin purificación adicional. LC/MS 195.2 (M + 1).

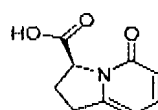
Paso B: Ácido [(6S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolo [1,2-] pirimidina- 6- carboxílico



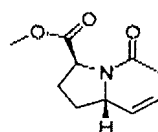
Se agitó [6 (S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolo [1 ,2- α] pirimidina- 6- carboxilato de metilo (9.95 g, 51.2 mmol) en tetrahidrofurano (60 ml), metanol (40 ml) y una solución de hidróxido de litio (3.32 g, 77 mmol) en agua (40 ml) a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó ácido clorhídrico 2N (38.5 ml) para neutralizar la mezcla de reacción luego la cual se purificó directamente mediante HPLC de fase inversa (TMC Pro- Pac C18; 0- 40% 0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo 0.1% de ácido trifluoroacético en gradiente de agua) . El producto de O- alquilación se eluyó rápidamente. Las fracciones puras se recogieron y se liofilizaron durante la noche para rendir el compuesto del título como un sólido amarillo pálido. ¹H RMN (DMSO- d₆): δ 7,89 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 6,24 (d, J- 6,6 Hz, 1H), 4,92 (dd, J = 10,0, 3,1 Hz, 1H), 3.12- 2.99 (m, 2H), 2,52 (m, 1H), 2,11 (m, 1H). LC/MS 181.2 (M + 1).

INTERMEDIO 46

Ácido (3S)- 5- oxo- 1,2,3,5- tetrahidroindolizina- 3- carboxílico (i- 46)

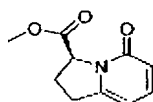


Paso A: Ester metílico del ácido (3S, 9S)- 5- oxo- 1, 2,3,5,6,8 a- hexahidroindolizina- 3- carboxílico



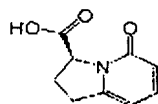
Este intermedio se preparó según los procedimientos encontrados en: Hanessian, S.; Sailes, H.; Munro, A.; Therrien, E.J. Org. Chem.. 2003, de 68, 7219 y Vaswani, R.G.; Chamberlin, R.J. Org. Chem. 2008, 73,1661.

Paso B: (3S)- 5- oxo- 1,2,3,5- tetrahidroindolizina- 3- carboxilato de metilo



A una solución agitada de 0.850 g (4.06 mmol) de éster metílico del ácido (3S, 9S)- 5- oxo- 1, 2,3,5,6,8 a- hexahidroindolizina- 3- carboxílico a partir del paso A anterior en 50 ml de diclorometano se agregó 6.30 g (72.5 mmol) de manganeso (IV) óxido y la mezcla resultante se agitó durante 12 horas a reflujo. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró a través de un lecho de Celite ®, y luego el sólido se lavó con 100 mL de diclorometano. El filtrado se evaporó a sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con 10- 50% de acetato de etilo en gradiente de hexanos para rendir el compuesto del título como una goma transparente (0.47 g, 55% de rendimiento). LC- MS: m/z (ES) 194 (MH)+.

Paso C: Ácido (3S)- 5- oxo- 1,2,3,5- tetrahidroindolizina- 3- carboxílico

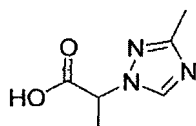


A una solución agitada de 0.200 mg (1.00 mmol) de (3S)- 5- oxo- 1,2,3,5- tetrahidroindolizina- 3- carboxilato de metilo a partir del paso B anterior en 3 ml de THF se agregó 1.5 mL (1.5 mmol) de una solución acuosa LiOH 1.0 M. La mezcla resultante se agitó durante 2

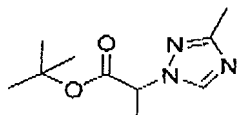
horas a ambiente temperatura después se apagó con 2.0 ml (2.0 mmol) de una solución acuosa de cloruro de hidrógeno 1.0 M. Todos los materiales volátiles se evaporó al vacío y la fase acuosa se extrajo con un IPA al 30% en mezcla de cloroformo (3x5 ml). El extracto combinado se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó al vacío para rendir el compuesto del título como un sólido blanco (0.17 g, 92%). ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD): δ 7,53 (dd, $J = 8,9, 7,1$ Hz, 1H), 6.38- 6.35 (m, 2H), 5,11 (dd, $J = 9,7, 2,7$ Hz, 1H), 3,23- 3,12 (m, 2H), 2,62- 2,53 (m, 1H), 2,35- 2,30 (m, 1H). LC- MS: m/z (ES) 180 (MH)+.

INTERMEDIO 56

Ácido- 2 (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanóico (i- 56)

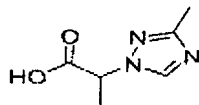


Paso A: 2- (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanoato de terc- butilo



A una solución de 3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol (7.3 g, 88 mmol) en DMF (75 ml) se agregó K_2CO_3 (60.7 g, mmol 439) y éster terc- butílico del ácido 2- bromopropiónico (14.6 ml, 88 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con EtOAc (500 ml), se lavó con agua (x 3) y luego con salmuera. Se secó sobre MgSO_4 y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con EtOAc/isoheptano (20 a 100%) para rendir 13 g del producto crudo como una mezcla 3:1 de regioisómeros. La mezcla se purificó mediante Chiracel OD con un gradiente de 4% a 30% de IP A/heptano. Luego, los dos primeros picos fueron separados con una columna Chiracel OD eluyendo isocráticamente con de IP A/heptano al 4%. El segundo pico se recolectó como el único estereoisómero deseado éster terc- butílico del ácido (R o S) 2- (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanóico (3.5 g, 19%). ^1H - RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8,05 (s, 1 H), 4,90 (q, $J = 7$ Hz, 1 H), 2,35 (s, 3 H), 1,72 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 1,40 (s, 9 H). ESI- MS calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: masa exacta: 211,13 Encontrado 156.05 (-tBu).

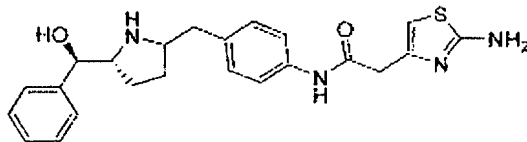
Paso B: Ácido 2- (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanóico



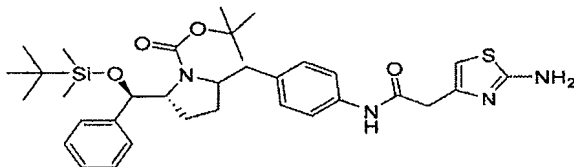
Se disolvió 2- (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanoato de terc- butilo (1.0 g, 4.7 mmol) en HCl 4 M en dioxano (100 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche . El producto se concentró bajo presión reducida y se secó a alto vacío para rendir 2- (3- metil- 1- H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanoato de (R o S) terc- butilo como la sal de HCl (850 mg). ESI- MS calculado para $C_6H_9N_3O_2$: masa exacta: 155.07 Encontrado 156.05.

COMPUESTO 1

2- (2- amino- 1 ,3- tiazol- 4- il)- N- [4- ({(5R)- [(R)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidinil} metil) fenil] acetamida

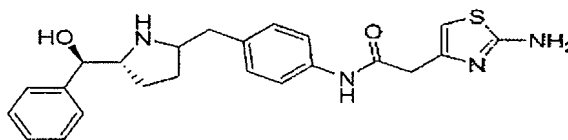


Paso A: (5R)- 2- (4- {[(2- amino- 1,3- tiazol- 4- il)acetil]amion} bencil)- 5- [(R)- {[terc- butil(dimetil)silil]oxi} (fenil)metil]pirrolidina- 1-carboxilato de terc- butilo



A una solución de 10 mg (5:1 mezcla cis/trans, 0.02 mmol) de (5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butil(dimetil)silil]oxi} (fenil)metil]pirrolidina- 1-carboxilato de terc- butilo (I- 3) y ácido (2- amino- 1 ,3- tiazol- 4- il) acético (3.18 mg, 0.02 mmol) en 0.5 ml de DMF anhidra se agregó una solución 0.5 M de HOAt en DMF (0.04 ml, 0.02 mmol) seguido por EDC (5.8 mg, 0.03 mmol) y DIEA (3.5 uL, 0.02 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 16 h. La mezcla se lavó con agua y se extrajo con diclorometano (2x2 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante placa TLC preparativa (500 μ M) eluyendo con MeOH al 5% en diclorometano para proporcionar el producto (10.3 mg, 81%). m/z (ES) 637 (MH)⁺, 659 (MNa)⁺.

Paso B: 2- (2- Amino- 1,3- tiazol- 4- il)- N- [4- ((5R)- [(R)hidroxi(fenil)metil]pirrolidinil}metil)fenil]acetamida

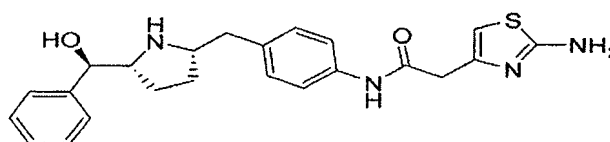


A una solución de 7 mg (0.01 mmol) de (5R)- 2- (4- {[2- amino- 1,3- tiazol- 4- il) acetil] amino} bencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil L) silil] oxi} (fenil) metil pirrolidina- 1- carboxilato de terc- butilo en metanol ml 0.20 (a partir del paso A) se agregó 0.20 ml de HCl concentrado y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. se Azeotropicó con tolueno (2x) para eliminar el agua. El residuo se absorbió en acetonitrilo/ agua / metanol (9:1:1) y se purificó sobre HPLC Gilson eluyendo con un gradiente de 0- 50% de acetonitrilo/agua con 0.05% de buffer de TFA. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para rendir una espuma blanca (3.3 mg, 71%). m/z (ES) 423 (MH)⁺. (- 5:1 Mezcla) ¹HRMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 7,56 (br d, J- 8,2 Hz, 2H), 7,44 (d, 7,8 Hz, 2H), 7,39 (t, J = 7,6 Hz, 2H) 7,35- 7,32 (m, 0,8 H) 7,32 a 7,29 (m, 0.2 H isómero menor), 7,26 (d, J- 8,0 Hz, 1.7H), 7,14 (d, J – 8.1 Hz, 0.3 H isómero menor) y 6.67 6.66 (br s, 0.2/0.8H, totalizando 1H). 4,72 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,80- 3,70 (m, 4H) 3,14 (dd, J = 6.1, 13.8 Hz, 1H), 2,95 (dd, J- 9.1,13.8 Hz, 1H), 2,08- 2,00 (m, 1H), 1,86- 1,74 (m, 3H).

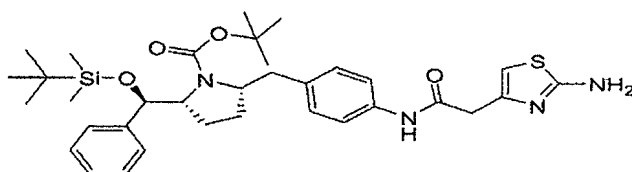
Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de β3 humano del Compuesto 1 se determinó que estaba entre 1 y 10 nM.

COMPUESTO 2

2- (2- amino- 1,3- tiazol- 4- il)- N- [4- ((2S, 5R)- [(R)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidinil} metil) fenil] acetamida

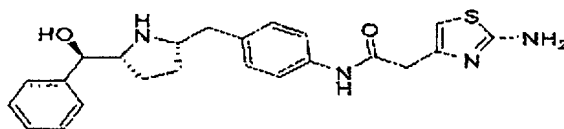


Paso A: (2S,5R)- 2- (4- {[2- amino- 1,3- tiazol- 4- il)acetil]amion}bencil)- 5- [(R)- {[ter- butil(dimetil)silil]oxi(fenil)metil]pirrolidina- 1-carboxilato de terc- butilo



El compuesto del título se preparó a partir de (2S, 5R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 4a) y ácido (2- amino- 1 ,3- tiazol- 4- il) acético según el procedimiento del Compuesto 1, paso A. El producto crudo se purificó mediante una placa de TLC preparativa eluyendo con MeOH al 5% en diclorometano para proporcionar el producto (4.1 mg, 21%). m/z (ES) 637 (MH)⁺, 659 (MNa)⁺.

Paso B: 2- (2- amino- 1 ,3- tiazol- 4- il)- N- [4- {(2S, 5R)- [(R) hidroxí (fenil) metil] pirrolidinil} metil] fenil] acetamida

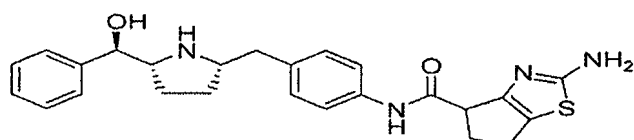


El compuesto del título se preparó a partir de 4 mg de (2S, 5R)- 2- (4- {[2- amino- 1 ,3- tiazol- 4- il) acetil] Amion} bencil)- 5- [(R)- {[terc- butilo (dimetil) silil] oxi} (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (a partir del paso A) de según el procedimiento del Compuesto 1, paso B. El producto crudo se purificó mediante HPLC Gilson eluyendo con un gradiente de 0- 50% de acetonitrilo/agua con buffer de TFA al 0.05% . Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para rendir una espuma blanca (3.3 mg, 71%). m/z (ES) 423 (MH)⁺. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 7,55 (br d, J- 8,2 Hz, 2H), 7,44 (d, 7,8 Hz, 2H), 7,39 (t, J- 7,6 Hz, 2H) 7,35- 7,33 (m, 1H), 7,25 (d, J- 8,0 Hz, 2H), 6,65 (br s, LH). 4,72 (4 J- 8,5 Hz, 1H), 3,80- 3,72 (m, 4H) 3,14 (dd, J- 6,1, 13,8 Hz, 1H), 2,96 (dd, J = 9.1,13.8 Hz, 1H), 2,07- 2,00 (m, 1H), 1,85- 1,73 (m, 3H).

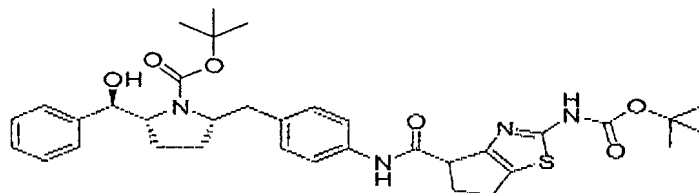
Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de β3 humano del Compuesto 2 se determinó que estaba entre 1 y 10 nM.

COMPUESTO 3

2- Amino- N- [4- {(2S 5R)- 5- [(R) hidroxí (fenil) metil] pirrolidin- 2- il) metil] fenil]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxamida

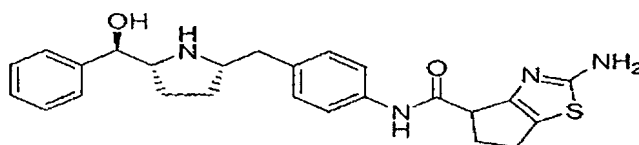


Paso A: (2S, SR)- 2- (4 [(2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- il} carbonil) amino] bencil}- 5- [(R)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo



A una solución de 220 mg (0.58 mmol) de (2S,5 R)- 2- (4- aminobencil)- 5- [(22)- hidroxi (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (i- 13a) y 164 mg (0.58 mmol) de ácido 2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxílico (i- 8) en DMF anhidra (5 ml) se agregó EDC (165 mg, 0.86 mmol), HOBt (132 mg, 0.86 mmol) y la base de Hunig (0.3 ml, 1.7 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se vertió en agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (3x30 ml), las capas combinadas de EtOAc se lavaron con agua (2 x 50 ml), NaCl saturado (25 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó mediante MPLC (Biotage Horizon: FLASH 25 + M) eluyente: 100 Hexanos% (100 ml), gradiente de 0 a 35% de EtOAc en hexanos (750 ml), luego EtOAc al 35% en hexanos (600 ml). Los diastereoisómeros separados mediante HPLC quiral sobre una columna AD (eluyente: IPA al 25% en heptano) primer isómero de elución (134 mg, 36%) segundo isómero de elución (126 mg, 34%) ambos como espumas blancas.

Paso B: 2- amino- N- [4- (((2S,5 R)- 5- [(R)- hidroxi (fenil) metil]- 2- pirrolidin il) metil) fenil]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4- carboxamida



A una solución de 126 mg (0.19 mmol) de (2S, 5R)- 2- (4 [(2- [(terc- butoxicarbonil) amino]- 5,6- dihidro- 4H- ciclopenta [α] [1,3] tiazol- 4-

il} carbonil) amino] bencil}- 5- [(R)- hidroxí (fenil) metil] pirrolidin- 1- carboxilato de terc- butilo (del paso A, segundo isómero de elución) en DCM (3 mL) se agregó ácido trifluoroacético (3.0 ml, 38mmol) la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se evaporó y se pasó a través de un cartucho SCX eluyendo con NH_3 2 M en metanol para liberar la base. El producto se purificó mediante TLC PREP- 2x [20 x 20cm x 1000 micras] eluyente: MeOH al 15% en DCM + dNH_4OH al 1% y el producto se liofilizó para rendir el compuesto del título (65 mg, 75%) como un sólido blanco esponjoso.

m/z (ES) 449 (MH)⁺. ¹HNMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,00 (s, 1H), 7,51 (d, J- 8,2, 2H), 7,30 (m "4H), 7,21 (t, J- 6,9, 1H), 7,12 (d, J- 8,2, 2H), 6,86 (s, 1H), 4,23 (d, J = 7.3, 1 H), 3,78- (m, 1H), 3,21 (m, 1H), 3,10 (m, 1H) 2,78 (m, 1H), 2,66 (m, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,49 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,40 (m, 1H), 1,39 (m, 2H).

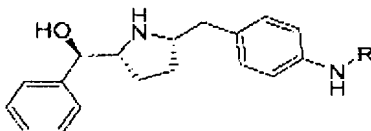
El producto del paso A [primer isómero de elución] (134 mg, 0.207 mmol) se desprotegió de forma similar para rendir el compuesto del título (44 mg, 48%) como un sólido esponjoso blanco, m/z (ES) 449 (MH)⁺.

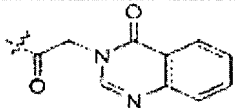
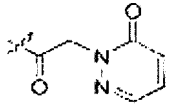
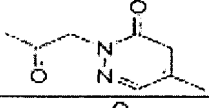
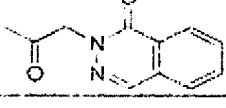
Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de $\beta 3$ humano del Compuesto 3 se determinó como menor que 1 nM.

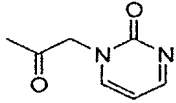
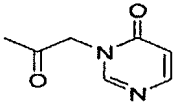
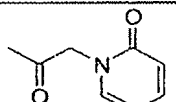
Compuestos 4- 10

Utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente, los compuestos 4- 10 se prepararon a partir de los materiales de inicio apropiados.

Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de $\beta 3$ humano de cada compuesto se determinó y se mostró en la siguiente tabla.

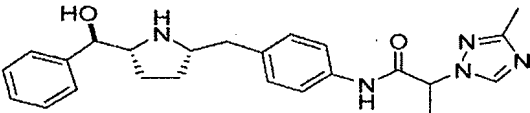


Número de Compuesto	R	PM	MS (ES) (MH) ⁺	UNION DE β3 HUMANO
4		468.56	469.50	1 – 10 NM
5		418.49	419.24	1 – 10 NM
6		432.53	433.50	1 – 10 NM
7		468.56	469.52	1 – 10 NM

8		418.50	419.48	1 – 10 NM
9		418.50	419.48	1 – 10 NM
10		417.51	418.50	1 – 10 NM

COMPUESTO 11

N- (4- (((2S,5R)- 5- ((R)- hidroxifenil)metil)pirrolidin- 2- il)metil)fenil)- 2- (3- metil- 1H- 1,2,4- triazol- 1- il)propanamida

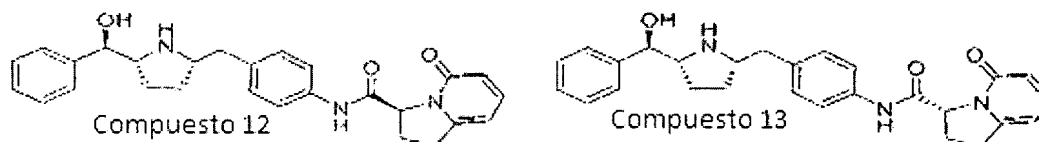


Una mezcla de i- 13a (2.00 g, 5.23 mmol), ácido 2- (3- metil- 1H- 1 ,2,4- triazol- 1- il) propanóico i- 56 (1.00 g, 5.23 mmol), HOAT en (1.307 ml, 0.784 mmol), y EDC (2.005 g, 10.46 mmol) en DMF (20 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se apagó con bicarbonato de sodio acuoso y se extrajo con EtOAc. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (0- 3% de MeOH (NH₄OH al 10%) en DCM. Después de la evaporación, el producto se purificó adicionalmente mediante HPLC quiral (columna AC, 30% IPA/heptanos) para rendir el intermedio boc protegido puro, el cual se disolvió en un volumen mínimo de dioxano y se agregó HCl 4 M en dioxano. Después de 2 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para rendir la sal de HCl del compuesto del título. HPLC de fase inversa básica (0.1% en H₂O NH₄OH, MeCN) proporcionó la base libre deseada del compuesto del título. ¹H- RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 8,51 (s, 1 H), 7,49 (d, J = 13 Hz, 2 H) 7,35- 7,29 (m, 4 H), 7,26- 7,20 (m, 4 H), 5,20 (q, J = 7,5 Hz, 1 H), 4,20 (d, J = 7,5 Hz, 1 H), 3,27 a 3,22 (m, 2 H), 2,80- 2,72 (m, 2 H), 2,34 (s, 3 H), 1,82 (d, J = 7,5 Hz, 3 H), 1,79 a 1,73 (m, 1 H), 1,52- 1,48 (m , 3 H) ESI- MS calculado para C₂₄H₂₉N₅O₂:. Masa exacta: 419.23, 420.35 encontrado.

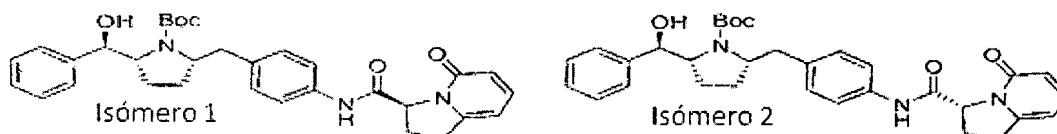
Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de β3 humano del Compuesto11 se determinó que estaba entre 1 y 10 nM.

COMPUESTOS 12 y 13

(3S)-N-[4-((2S,5R)-5-[(R)-hidroxi(fenil)metil]pirrolidin-2-il)metil]fenil]1-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-3-carboxamida (Compuesto 12) y (3R)-N-[4-((2S,5R)-5-[(R)-hidroxi(fenil)metil]pirrolidin-2-il)metil]fenil]-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-3-carboxamida (Compuesto 13)



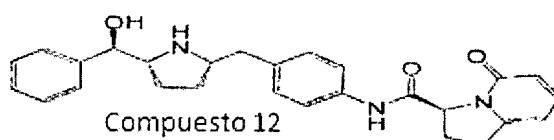
Paso A: (2R,5S)-2-[(R)-hidroxi(fenil)metil]-5-[4-[(3S)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-3-il]carbonil]amino)encil]pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo (isómero 1) y (2R,5S)-2-[(R)-hidroxi(fenil)metil]-5-[4-[(3R)-5-oxo-1,2,3,5-tetrahidroindolizina-3-il]carbonil]amino)encil]pirrolidina-1-carboxilato de terc-butilo (Isómero 2)



A una solución de 0.610 g (1.60 mmol) del Intermedio I-13a y 0.300 g (1.67 mmol) del Intermedio I-46 en 3.2 ml de N,N-dimetilformamida bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 0.033 g (0.24 mmol) de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol seguido por 0.336 g (1.75 mmol) de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se apagó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3x10 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de gel de sílice eluyendo con un gradiente de 50-100% acetato de etilo en hexanos para rendir los compuestos del título como una mezcla de diastereoisómeros en una relación 97:3. Los dos diastereómeros se separaron mediante HPLC quiral empleando una columna Daicel CHIRALPAK® AD® (eluyente: 40% IP A en heptano). El primer diastereoisómero de elución se designó como isómero 2 y es un sólido incoloro (0.020 g, 2.3%). LC-MS: m/z (ES) 544.2 (MH)+.

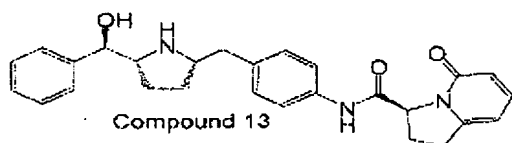
El segundo diastereoisómero de elución se designó como isómero 1 y es un sólido incoloro (0.650 g, 75%). LC- MS: m/z (ES) 544.2 (MH)+.

Paso B (Compuesto 12): (3S)- N- [4- ((2S, 5R)- 5- [(R)- hidroxi (fenil) metil]- 2- pirrolidinil} metil) fenil]- 5- oxo- 1- tetrahidroindolizina ,2,3,5- 3- carboxamida



Una solución de 0.500 g (0.920 mmol) de isómero 1 a partir del paso A anterior 2 mL de isopropanol bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó 4.0 mL de una solución de cloruro de hidrógeno anhidro 4.0 M en 1,4- dioxano. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h. y luego se evaporó a sequedad al vacío. La mezcla de reacción cruda se purificó mediante HPLC de fase inversa (TMC Proc- Pac; 0- 75% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo 0.01% ácido trifluoroacético en un gradiente de agua). Las fracciones puras se liofilizaron durante la noche después se disolvieron en una mezcla de 10 ml de cloroformo y 4 ml de una solución acuosa saturada de bicarbonato. La mezcla bifásica se agitó vigorosamente durante 10 min, luego las capas se separaron. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (3x10 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío para rendir el compuesto del título (Compuesto 12) como un sólido blanco (0,39 g, 95%). ¹H- RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 7,89 (s, 1 H), 7,54 (dd, J = 8.8,7.2 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,34- 7,29 (m, 4H), 7,26- 7,23 (m, 1H), 7,20 (d, J- 8,2 Hz, 2H), 6,38- 3,36 (m, 2H), 5,24 (dd, J = 9.4,2.8 Hz, 1H), 4,20 (d , J = 7,8 Hz, 1H), 3,35- 3,23 (m, 3H), 3,19 a 3,12 (m, 1H), 2,82- 2,71 (m, 2H), 2,60- 2,51 (m, 1H), 2,37- 2,32 (m , 1H), 1,79- 1,72 (m, 1H), 1,52- 1,43 (m, 3H). . LC- MS: m/z (ES) 444.0 (MH)+.

Paso B (Compuesto 13): (3R)- N- [4- ((2S,5R)- 5- [(R)- hidroxi(fenil) metil]pirrolidin- 2- ilimetil)fenil]- 5- oxo- 1,2,3,5- tetrahidroindolizina- 3- carboxamida



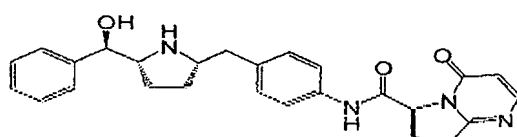
El mismo procedimiento se empleó para la desprotección de isómero 2 a partir del paso A anterior para rendir el compuesto del título (Compuesto 13) como un diastereómero individual.

LC- MS: m/z (ES) 444.0 (MH)+.

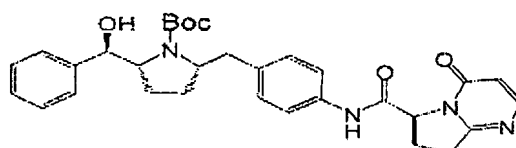
Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional de $\beta 3$ humano de los Compuestos 12 y 13 se determinó que estaba entre 1 y 10 nM.

COMPUESTO 14

(6S)- N- [4- ((2S,5R)- 5- [(R)- hidroxi(fenil)metil]pirrolidin- 2- il}metil)fenil]- 4- oxo- 4,6,7,8- tetrahidropirrolol[1,2- α]pirimidina- 6- carboxamida



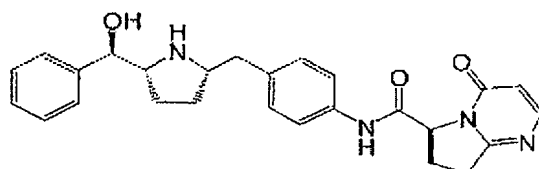
Paso A: (2R, 5R)- 5- [(R)- hidroxi(fenil)metil]pirrolidin- 2- il}metil)fenil]- 4- oxo- 4,6,7,8- tetrahidropirrolol[1,2- α]pirimidin- 6-il}carbonil}amino)encil]pirrolidina- 1-carboxilato de terc-butilo



A una solución de i- 13a (21.4 g, 55.9 mmol) en N,N- dimetilformamida (100 ml) a 0 ° C se agregó ácido [(6S)- 4- oxo- 4 ,6,7,8- tetrahidropirrolol [1, 2- α] pirimidina- 6- carboxílico (I- 44, 11.1g, 61.5 mmol), seguido de 1- hidroxibenzotriazol (7.55 g, 55.9 mmol), hidrocloreto de N- (3- dimetilaminopropil)- N'- etilcarbodiimida (16.1 g , 84.0 mmol) y N, N- diisopropiletilamina (29.2 ml, 168 mmol). La mezcla de reacción se agitó a partir de 0 ° C a temperatura ambiente durante 2 h. Se agregó agua (600 ml) y se extrajo con diclorometano (600 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la eliminación de los materiales volátiles, el residuo se purificó mediante un sistema de Biotage Horizon ® (0- 5% después metanol al 5% con 10% de amoníaco/mezcla diclorometano) para rendir el compuesto del título que contenía 8% del diastereoisómero menor. Este se purificó adicionalmente mediante cromatografía de fluidos supercríticos (columna AS quiral, metanol al 40%) para rendir el compuesto del título, como un sólido amarillo pálido (22.0 g, 72%). ¹H RMN (CDCl₃): δ 9,61 (s, 1H), 7,93 (d, t- 6,6 Hz, 1H),

7,49 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7.35- 7.28 (m, 5H) S 7,13 (d , J = 8,5 Hz, 2H), 6,40 (d, J = 6,7 Hz, 1H), 5,36 (d, J- 8,6 Hz, 1H), 4,38 (m, 1H), 4.12- 4.4 (m, 2H), 3,46 (m, 1H), 3.15- 3.6 (m, 2H), 2,91 (dd, J- 13,1, 9,0 Hz, 1H), 2,55 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 1.71- 1.49 (m, 13H). 567.4 LC- MS (M 23).

Paso B: (6S)- N- [4- ((2S, 5R)- 5- [(R) hidroxil (fenil) metil] pirrolidin- 2-il) metil] fenil]- 4- oxo- 4,6,7,8- tetrahidropirrol [1,2- α] pirimidina- 6- carboxamida



A una solución del intermedio a partir del paso A (2.50 g, 4.59 mmol) en diclorometano (40 ml) se agregó ácido trifluoroacético (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de la eliminación de los materiales volátiles, se agregó NaHCO₃ saturado para llevar el valor del pH a 8- 9. La mezcla se extrajo luego con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄. Después de la concentración, la cristalización a partir de metanol/acetonitrilo proporcionó el compuesto del título como un sólido blanco (1.23 g, 60%). ¹H RMN (DMSO- d₆): δ 10,40 (s, 1H), 7,91 (d, J- 6,7 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7.32- 7.26 (m, 4H), 7,21 (m, 1H), 7,15 (d, J- 8,4 Hz, 2H), 6,23 (d, J- 6,7 Hz, 1H), 5,11 (dd, J- 9.6,2.9 Hz, 1H), 5,10 (br, 1H) , 4,21 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 3,20- 3,00 (m, 4H), 2.66- 2.51 (m, 3H), 2,16 (m, 1H), 1,57 (m, 1H), 1,38 (m, 1H), 1.29 a 1.23 (m, 2H). LC- MS 445.3 (M + 1).

Utilizando los ensayos biológicos descritos en la presente, la actividad funcional β₃ del Compuesto 14 se determinó que era entre 11 a 100 nM.

Los compuestos 15-29 se prepararon utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente a partir de materiales de inicio apropiados.

Ensayos biológicos para actividades funcionales de β₃: Los siguientes ensayos in vitro son adecuados para seleccionar compuestos que tienen actividad agonista β₃ selectiva:

Ensayo Funcional: La producción de AMPc en respuesta a ligando se mide de acuerdo con Barton,(1991, desensibilización inducida por agonistas de los receptores de dopamina D2 en células humanas de retinoblastoma Y-79. Mol. Pharmacol. V3229 :650-658) modificada como sigue. La producción de AMPc se mide utilizando un inmunoensayo de transferencia de energía

porresonancia fluorescente resuelta en el tiempo (Lance™, Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante. Células de ovario de hámster chino (CHO), transfectadas establemente con el receptor 6-adrenérgico clonado ($\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$) se cosechan después de 3 días de subcultivo. La recolección de las células se hace con el método de disociación libre de enzimas (Specialty Media). Luego las células son contadas y resuspendidas en buffer de ensayo (solución salina balanceada de Hank suplementada con HEPES 5 mM, BSA al 0.1%) que contiene un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX, 0.6 mM). La reacción se inicia mediante la mezcla de 6.000 células en 6 μ L de anticuerpo AMPc rotulado con Alexa Fluor (Lance™ Kit) el cual se añade a un pozo de ensayo que contiene 12 μ L del compuesto (diluido en buffer de ensayo a concentración final 2X). La reacción transcurre durante 30 min a temperatura ambiente y se termina mediante la adición de 24 μ L de buffer de detección (Kit Lance™). Luego la placa de ensayo se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y la fluorescencia resuelta por tiempo se mide en un lector Perkin Elmer Envision o equivalente. El nivel de AMPc desconocido se determina mediante la comparación de niveles de fluorescencia con una curva estándar de AMPc.

El ligando β -adrenérgico agonista completo isoproterenol se utiliza en los tres receptores para determinar la estimulación máxima. El ligando selectivo del receptor adrenérgico (AR) $\beta 3$ humano (S)-N-[4 - [2 - [[2-hidroxi-3-(4-hidroxifenoxi) propil] amino]etil]-fenil]-4-yodobenzenosulfonamida se utiliza como un control en todos los ensayos. El isoproterenol es titulado a una concentración final en el ensayo de 10^{-10} M a 10^{-5} y el ligando selectivo (S)-N-[4 - [2 - [[2-hidroxi-3-(4-hidroxifenoxi) propil] amino] etil] fenil]-4-yodobenzenosulfonamida se titula en el receptor $\beta 3$ a una concentración de 10^{-10} M a 10^{-5} M. Ligandos desconocidos son titulados en los 3 subtipos de receptores β -adrenérgicos a una concentración final en el ensayo de 10^{-10} M a 10^{-5} M para determinar el EC_{50} . El EC_{50} se define como la concentración de compuesto que proporciona activación del 50% de su propio máximo. Los datos se analizaron con Microsoft Excel y Graphpad Prism o un paquete de software de análisis de datos desarrollado internamente.

Ensayo de Unión: Los compuestos también se ensayan en los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ para determinar la selectividad. Todos los ensayos de unión se ejecutan utilizando membranas preparadas a partir de células CHO que expresan de manera recombinante receptores $\beta 1$ o $\beta 2$. Las células se cultivan durante 3-4 días posterior a la división; las células adheridas se lavan con PBS y luego se son lisadas en 1mM Tris, pH 7.2 durante 10 minutos en hielo. Los matraces se raspan para

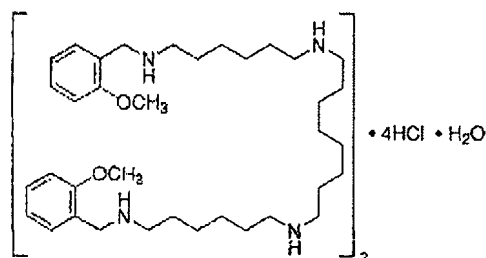
eliminar las células y las células se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de teflón/vidrio. Las membranas se recogieron por centrifugación a 38.000 x g durante 15 min a 4 °C. Las membranas peletizadas son resuspendidas en buffer TME (50 mM Tris, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA) a una concentración de 1 mg de proteína/ml. Lotes grandes de membranas se pueden preparar, alicuotar y almacenar a -70 °C hasta un año sin pérdida de potencia. El ensayo de unión se lleva a cabo mediante la incubación de las membranas en conjunto (2-5 µg de proteína), el trazador radiomarcado ¹²⁵I-cianopindolol (¹²⁵I-CYP, 45pM), 200 µg de perlas SPA WGA-PVT (GE Healthcare) y los compuestos de prueba a concentraciones finales que van desde 10⁻¹⁰ M hasta 10⁻⁵ M en un volumen final de 200 µL de buffer TME que contiene BSA al 0.1%. La placa de ensayo se incuba durante 1 h con agitación a temperatura ambiente y luego se coloca en un contador de centelleo Trilux Perkin Elmer. Las placas se dejan en reposo en el contador Trilux durante aproximadamente 10 h en la oscuridad antes del conteo. Los datos son analizados utilizando un análisis de regresión no lineal estándar de 4 parámetros utilizando software GraphPad Prism o un paquete de análisis de datos desarrollado internamente. El IC₅₀ se define como la concentración del compuesto capaz de inhibir el 50% de la unión del trazador radiomarcado (¹²⁵I-CYP). La selectividad del compuesto para el receptor β₃ puede determinarse mediante el cálculo de la relación (IC₅₀ β₁ AR, β₂ AR)/(EC₅₀ β₃ AR).

El agonista β₃-AR y el agente antimuscarínico pueden ser administrados al paciente en una relación por peso de 500:1 a 1:50. En una realización, la relación por peso del agonista β₃-AR y el agente antimuscarínico es 300:1 a 1:10. En otra realización, la relación por peso es 300:1 a 1:1. En otra realización, la relación por peso es 150:1 a 1:1. En otra realización, la relación por peso es 100:1 a 1:1. En otra realización, la relación en peso es 150:1. En aún otra realización, la relación por peso es de 100:1.

La terapia de combinación puede comprender además un antagonista M₂ selectivo además de un agonista β₃-AR y un agente antimuscarínico.

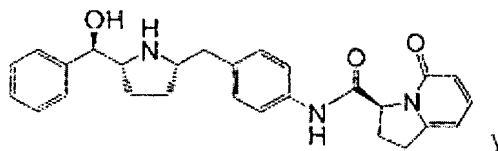
Como se utiliza en la presente, la frase "antagonista M₂ selectivo" es un compuesto que antagoniza el subtipo M₂ muscarínico a selectividad mayor de 10 veces en comparación con otro subtipo muscarínico, por ejemplo, el subtipo M₃. Ver Delmendo, Br J Pharmacol. 1989 Feb; 96 (2): 457-64, el cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, para discusiones de los antagonistas selectivos.

En una realización, el antagonista M_2 selectivo es metoctramina. La metoctramina es un derivado de tetramina de polimetileno que tiene la estructura siguiente:

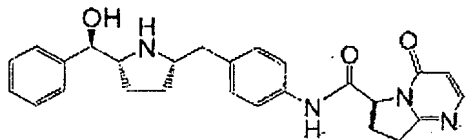


En una realización, un método de tratamiento de HV comprende administrar a un paciente que lo necesite una agonista β_3 -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivo. En una realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 mayor de aproximadamente 40. En otra realización, el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de más de aproximadamente 50. En una realización, el agente antimuscarínico es darifenacina. En una realización, la relación M_2/M_3 se mide utilizando los ensayos de unión a receptores descritos en Ohtake

En una realización, un método de tratamiento de HV comprende administrar a un paciente que lo necesite un agonista β_3 -AR, darifenacina, y metoctramina. En otra realización, el agonista β_3 -AR se selecciona de los compuestos que se muestran en la Tabla 3. En otra realización, el agonista β_3 -AR se selecciona de los compuestos que se muestran en la Tabla 4. En otra realización, el agonista β_3 -AR



se selecciona del grupo formado por



En un método en el que un agonista β_3 -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivo se administran a un paciente, el agonista β_3 -AR puede ser pre-tratado con el antagonista M_2 selectivo. En una realización, el antagonista M_2 selectivo es metoctramina. En otra realización, el agente antimuscarínico es darifenacina. En otra realización, el agonista β_3 -AR es

pre-tratado con metoctramina. En otra realización, el agonista $\beta 3$ -AR pre-tratado con metoctramina se administra conjuntamente con darifenacina.

En una realización, la concentración de metoctramina para el pre-tratamiento es 0.1 a 10 μ M. En otra realización, la concentración de metoctramina para el pre-tratamiento es de 1 μ M.

En las terapias de combinación descritas anteriormente, el agonista $\beta 3$ -AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M_2 selectivo opcional pueden ser administrados a un paciente de forma simultánea, secuencial o por separado.

En una realización, el agonista $\beta 3$ -AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M_2 selectivo opcional se administran al paciente de forma simultánea. En otra realización, el agonista $\beta 3$ -AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M_2 selectivo opcional se administran al paciente por separado. En aún otra realización, el agonista $\beta 3$ -AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M_2 selectivo opcional se administran al paciente de forma secuencial.

Los pacientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, personas con hiperreflexia vesical o los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS por su sigla en inglés). En una realización, el paciente es una mujer con condiciones de HV. En otra realización, el paciente es una mujer menopáusica con las condiciones de HV.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica de combinación que comprende un agonista $\beta 3$ -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivo opcional. Agonistas $\beta 3$ -AR adecuados, agentes antimuscarínicos y antagonistas M_2 selectivos son como se describieron anteriormente.

La cantidad adecuada del agonista β_3 -AR en la composición de combinación es desde aproximadamente 0.01 mg a 500 mg. En una realización, la cantidad del agonista β_3 -AR está entre 0.05 mg y 250 mg. En otra realización, la cantidad está entre 0.1 mg y 150 mg aproximadamente. En otra realización, la cantidad está entre 1 y 100 mg aproximadamente. En otra realización, la cantidad está entre 1 y 50 mg aproximadamente.

La cantidad adecuada del agente antimuscarínico en la composición de combinación está entre 0,01 mg y 50 mg aproximadamente. En una realización, la cantidad del agente antimuscarínico está entre 0.05 mg y 12 mg de aproximadamente. En otra realización, la cantidad está entre 0.1 mg y 6 mg aproximadamente. En otra realización, la cantidad está entre 0.2 y 5 mg aproximadamente. En otra realización, la cantidad está entre 0,2 y 3 mg aproximadamente.

La cantidad adecuada del antagonista M_2 selectivo está entre 0.01 mg y 50 mg aproximadamente. En una realización, la cantidad de antagonista M_2 selectivo está entre 0.05 mg y 15 mg aproximadamente.

En el uso práctico, el agonista β_3 -AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M_2 selectivo opcional pueden combinarse como los ingredientes activos en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico según las técnicas convencionales de formación de composiciones farmacéuticas. El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para administración, por ejemplo, por vía oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para forma de dosificación oral, cualquiera de los medios farmacéuticos habituales pueden ser empleados, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tal como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares, en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas y tabletas, con las preparaciones sólidas orales siendo preferidas sobre las preparaciones líquidas.

Debido a su facilidad de administración, las tabletas y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa en cuyo caso se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden ser recubiertos por técnicas estándar acuosas o técnicas no acuosas. Tales composiciones y preparaciones de combinación pueden contener 0.1 a 20 por ciento de cada ingrediente activo. El porcentaje de ingredientes activos en estas

composiciones de combinación puede, por supuesto, ser variado y la cantidad de ingredientes activos en tales composiciones es tal que una dosis efectiva será obtenida.

Los ingredientes activos se pueden administrar también por vía intranasal como, por ejemplo, las gotas de líquido o aerosol.

Las tabletas, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también un aglutinante tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio, y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma de dosificación unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.

Varios otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, las tabletas pueden ser recubiertas con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o naranja.

Los ingredientes activos también se pueden administrar por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de estos ingredientes activos se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un surfactante tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones de combinación adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de administrarse fácilmente con jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

En una realización, la composición de combinación es una composición oral. En otra realización, la composición oral es un gel de cápsula. En otra realización, la composición de

combinación es una composición de tableta oral. En aún otra realización, la composición de combinación es una composición oraldeperlas.

En una realización, la composición de combinación es una composición de liberación controlada en donde el agente antimuscarínico se libera durante 24 horas después de la administración de la composición. En otra realización, el agente antimuscarínico se libera durante 10 horas. En otra realización, el agente antimuscarínico se libera durante 8 horas. En otra realización, el agente antimuscarínico se libera durante 6 horas.

También se divulga en la presente el uso de un agonista $\beta 3$ -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 selectivoopcionalen la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperreflexia vesical.

EJEMPLOS

Los efectos de la co-administración de un agonista $\beta 3$ -AR, un agente antimuscarínico, y un antagonista M_2 opcional se ilustran en los siguientes ejemplos.

CL 316243, o (R, R) -5 - (2 - ((2 - (3-clorofenil)-2-hidroxietil)-amino) propil)-1 ,3-benzodioxol-2 ,3-dicarboxilato de disodio, es un agonista $\beta 3$ -AR. CL 316243 se describe con más detalle en J. Med.. Chem.. 1992 07 de agosto, 35 (16) :3081-4.

Tolterodina, o 2 - [(1S) -3 - (diisopropilamino)-1-fenilpropil]-4-metilfenol, es un agente antimuscarínico utilizado para tratar la hiperreflexia vesical. La tolterodina se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. No. 5.382.600, 6.630.162, 6.770.295, y 6.911.217.

Oxibutinina, o 4-dietilaminobut-2-inil2-ciclohexil-2-hidroxi-2-fenil-etanoato, es un agente antimuscarínico utilizado para aliviar las dificultades urinarias y de vejiga, incluyendo necesidad frecuente de orinar y la incapacidad para controlar la orina (incontinencia de urgencia), al disminuir los espasmos musculares de la vejiga.

Darifenacina, o (S) -2- [1-[2 - (2,3-dihidrobenzofuran-5-il) etil] pirrolidin-3-il] -2,2-difenil-acetamida, es un agente antimuscarínico utilizado para tratar la incontinencia urinaria. La darifenacina se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N ° 5.096.890.

Ejemplos 1 - 3

Materiales y Métodos

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron para los Ejemplos 1-3. Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley. Después de la eutanasia con gas CO₂, se retiró la vejiga entera. Se prepararon tiras longitudinales (aproximadamente 6 mm x 3 mm) de la porción extratrigoanal del músculo detrusor. Cada tira se colocó en un baño de órganos (25 ml) calentado que contiene solución de Krebs oxigenada (95% O₂ + 5% CO₂). Las tiras fueron atadas en un extremo al baño de órganos, y conectadas en el otro extremo a un transductor isométrico (AD Instruments) bajo una tensión de reposo de 10 mN. Las respuestas de las preparaciones se registraron a una tasa de muestreo de 10 Hz mediante un sistema de adquisición de datos de canal múltiple (PowerLab, AD Instruments), y se midieron con un software de análisis (Chart, AD Instruments). Después del período de balanceo durante al menos 60 minutos, cada tira de tejido se expuso a estimulación de campo eléctrico (EFS) a 60 Hz; duración, 0.3 ms; 3 seg; 90 V para inducir las contracciones. Tras la obtención de las contracciones estables con EFS, la solución de compuesto (25 µL) se aplicó en el baño de órganos de manera acumulativa. Después de 15 minutos de cada tratamiento con el compuesto, se aplicó EFS.

Análisis Isobolográfico

El análisis isobolográfico se utilizó para evaluar el efecto sinérgico de una terapia de combinación. El análisis isobolográfico proporciona una evaluación visual de la interacción de dos agentes diferentes que utilizan el análisis estadístico independiente. El análisis estadístico se puede lograr a partir de cálculos de ciertos índices potencia del tratamiento individual de cada compuesto y combinaciones de relación fija para el mismo efecto. El análisis isobolográfico se describe con más detalle en JPET 298:865-872, 2001, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Un diagrama ilustrativo de análisis isobolográfico se muestra en la figura. 1. En la figura. 1, el isobograma por algún efecto particular (por ejemplo, 50% del máximo) en el cual la dosis de agente activo A solo es A = 20 y agente activo B solo es B = 100. La línea recta que une estos puntos de intersección (línea de aditividad) es el lugar geométrico de todos los pares de dosis que, sobre la base de estas potencias, debe dar el mismo efecto. Un par de dosis real, tal como el punto Q alcanza este efecto con cantidades menores y es sinérgica (o super-aditiva), mientras que el par de dosis indicado por el punto R significa que mayores cantidades se requieren y es por lo tanto

sub-aditiva. Un punto tal como P que aparece cerca de la línea AB es simplemente aditivo. Un análisis estadístico adecuado se utiliza a menudo para demostrar la naturaleza de la interacción.

Ejemplo 2

Terapia de Combinación del agonista β 3-ARCL316243 con un Antimuscarínico Seleccionado de Tolterodina, Oxibutinina y Darifenacina

Cuando se administró de forma individual, cada uno de CL316243, tolterodina, oxibutinina y darifenacina inhibió las contracciones del músculo detrusor aislado inducido por EFS. La Tabla 5 muestra la concentración de cada compuesto que indujo inhibición del 25%. Estos valores se utilizaron para los siguientes análisis isobolográficos.

Tabla 5. Inhibición de la contracción del detrusor con CL316243, tolterodina, oxibutinina y darifenacina

Compuesto	IC24 (nM)
Agonista β 3-AR	
CL316.243	2.86
Antimuscarínicos	
Tolterodina	4.71
Oxibutinina	22.28
Darifenacina	5.84

En la terapia de combinación, CL316243 se administra conjuntamente con tolterodina, oxibutinina o darifenacina en relaciones de peso fijos y los resultados de los análisis isobolográficos se muestran en la Figura 2. La figura 2 indica que las combinaciones de CL316243 con tolterodina (1:2, la Figura 2A) o oxibutinina (1:10, la Figura 2B) mostraron efectos sinérgicos. Por otro lado, la combinación de CL316243 con darifenacina (1:2, la Figura 2C) parece ser simplemente aditiva (es decir, ningún efecto sinérgico).

Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se cree generalmente que la actividad antagonista M_3 de un agente antimuscarínico es importante para la eficacia HV (véase, por ejemplo, Abrams y Andersson. BJU Int., 100, 987-1006 (2007)). Sorprendentemente, ahora se ha

encontrado que la selectividad relativa de M_2/M_3 del agente antimuscarínico puede jugar un papel importante para la eficacia de HV y/o efectos secundarios reducidos en la terapia de combinación con el agente antimuscarínico y un agonista β_3 -AR.

Como puede verse a partir de los resultados anteriores, el agente antimuscarínico tolterodina tiene selectividad aproximadamente igual sobre los subtipos M_2 y M_3 de los receptores muscarínicos ($M_2/M_3 \approx 1$), y la combinación de tolterodina y CL316243, un agonista β_3 -AR, en relación 2:1 proporcionó el efecto sinérgico. Otro agente antimuscarínico oxibutinina, que tiene una relación M_2/M_3 de aproximadamente 6, también proporcionó efecto sinérgico cuando se combinó con CL316243 en una proporción 10:1.

Por otro lado la darifenacina que tiene una selectividad mucho mayor para M_3 que M_2 ($M_2/M_3 \approx 50$), no proporcionó la sinergia cuando se combinó con CL316243 en una proporción 2:1.

En resumen, la combinación de CL316243 con tolterodina o oxibutinina, cada una de éstas con una relación M_2/M_3 menor de 40, proporcionó sinergia en la inhibición de la contracción del detrusor. Por otro lado, la combinación de CL316243 con darifenacina, que tiene una proporción M_2/M_3 mayor de 40, no proporcionó sinergia.

Ejemplo 3

Compuesto 12 Agonista de β_3 -AR en combinación con Tolterodina o Darifenacina

En este ejemplo, un agonista β_3 -AR diferente se utilizó para estudiar el efecto sinérgico de la terapia de combinación de un agonista β_3 -AR y un agente antimuscarínico.

El compuesto 12 de agonista β_3 -AR descrito anteriormente en la Tabla 3 inhibió las contracciones del detrusor aislado inducido por EFS con un valor IC_{25} de 275 nM. Así, el compuesto 12 es casi 100 veces menos potente que CL316243 (IC_{25} 2.86 nM, ver Tabla 5) en la inhibición de la contracción inducida por EFS de tiras de vejiga de rata. Esto es coherente con la actividad menos potente del Compuesto 12 en β_3 -AR de rata.

En el estudio de combinación, el Compuesto 12 se co-administró con tolterodina o darifenacina en una relación por peso fijo de 50:1. Los resultados de los análisis isobolográficos se muestran en la figura. 3. La figura. 3 indica que la combinación del Compuesto 12 con tolterodina, que tiene M_2/M_3 de aproximadamente 1, en relación 50:1 (figura 3A), proporcionó efecto sinérgico.

Por otro lado, la combinación del Compuesto 12 con darifenacina, que tiene M_2/M_3 de aproximadamente 50, en relación 50:1 (Fig. 3B), no proporcionó efecto sinérgico (sub-aditivo).

Los resultados anteriores son consistentes con los resultados observados en el Ejemplo 1, donde un agonista $\beta 3$ -AR diferente (CL316243) se utilizó en los estudios. Estos resultados sugieren que cuando el antimuscarínico tiene relación M_2/M_3 de menos de 40, su combinación con un agonista $\beta 3$ -AR proporcionó la sinergia en la inhibición de la contracción del detrusor. Por otro lado, cuando el agente antimuscarínico tiene relación M_2/M_3 superior a 40, su combinación con un agonista $\beta 3$ -AR no proporcionó ninguna sinergia.

Ejemplo 4

Efecto del Antagonista M_2 Selectivo en el Efecto Sinérgico de la Terapia de Combinación

En este ejemplo, se estudia el efecto de un antagonista M_2 selectivo en la terapia de combinación de un agonista $\beta 3$ -AR y un agente antimuscarínico que tiene relación M_2/M_3 superior a 40.

En primer lugar, CL 316243, un agonista $\beta 3$ -AR, fue no tratado o pre-tratado con metoctramina (1 μ M) y los resultados se muestran en la figura. 4. La figura 4 muestra que el pretratamiento de CL316243 con metoctramina no afectó significativamente la potencia de CL316243 en lo que respecta a la inhibición de la contracción de la vejiga inducida EFS. Este resultado es consistente con la creencia general de que un antagonista M_2 selectivo por sí solo no relaja las tiras de vejiga de rata pre-contráidas al igual que los agonistas $\beta 3$ -AR y antimuscarínicos con antagonismo M_3 . Esto sugiere que la combinación de un antagonista M_2 selectivo y CL316243, y sin la presencia de antagonismo M_3 , no proporcionó la sinergia.

A continuación, cada uno del CL316243 sin tratar (A) y pre-tratado (B) se combinó con darifenacina, respectivamente, en una proporción de 1:2 y los resultados se muestran en la figura. 5. La figura 5 indica que la combinación de CL316243 pre-tratado (con metoctramina 1 μ M) y darifenacina en proporción 1:2 proporcionó un efecto sinérgico. Como se discutió anteriormente, darifenacina es un antagonista M_3 selectivo y tiene proporción M_2/M_3 de aproximadamente 50.

Por otro lado, la combinación de CL316243 sin tratar y darifenacina en la misma proporción (1:2) fue simplemente aditiva (es decir, ningún efecto sinérgico).

Estos resultados son consistentes con las observaciones en los Ejemplos 1 y 2 que el efecto sinérgico de la combinación entre un agonista $\beta 3$ -AR y un agente antimuscarínico puede requerir la presencia de antagonismo de M_2 y M_3 .

Mientras no se desea ser limitado por la teoría, se cree que los receptores M₂ pueden jugar un papel en la mediación de una respuesta contráctil indirecta mediante la inversión de la relajación mediada por receptores adrenérgicos a través de un mecanismo dependiente de AMPc. El antagonismo de M₂ puede potenciar el aumento de AMPc inducido por el agonista β₃-ARy la apertura de canales BK, resultando en una mayor relajación del músculo detrusor.

Ejemplo 5

Efecto de Proporciones de Combinación sobre el Efecto Sinérgico

Materiales y Métodos

- Animales: ratas hembra SD (200-250 g de peso corporal) (siete grupos en total).
- Anestesia: uretano (1,0 g/kg, por vía intraperitoneal).
- Parámetro: amplitud de la contracción de la vejiga rítmica inducida por distensión.
- Compuestos: oxibutinina (Oxy), CL 316243 (CL).
- Análisis: isoblograma utilizando los valores ID20 (dosis decrecientes de amplitud en un 20%).

Primero, se realizó un estudio de dosificación única para calcular los valores ID20 de oxibutinina (OXY) y CL316243 (CL) en las siguientes condiciones y los valores ID20 obtenidos se muestran en la Tabla 6:

- Vehículo (solución salina);
- OXY, 0.01, 0.03, 0.1 mg/kg, por vía intravenosa;
- CL, 0.003, 0.01, 0.03 mg/kg, por vía intravenosa.

Tabla 6. Valores ID20 de CL316243 y oxibutinina.

Compuesto	ID20
	(MPK, iv).
Oxibutinina	0.057

Los resultados de la Tabla 6 muestran que tanto la oxibutinina como CL316243 disminuyeron la amplitud de la contracción de la vejiga rítmica inducida por distensión en ratas hembra anestesiadas.

A continuación, los regímenes de dosificación de combinación mostrados en la Tabla 7 se realizaron para componer un isoblograma. Hubo 9 grupos en total. Los valores ID20 de OXY y CL se calcularon en cada tasa de combinación.

Tabla 7. Regímenes de dosificación (mg/kg).

OXY: CL	01:01	10:01	03:01
gimen 1	0.003:0.003	0.03:0.003	0.01:0.003
gimen 2	0.01:0.01	0.1:0.01	0.03:0.01
Régimen 3	0.03:0.03	0,3: 0,03	0.1:0.03

La figura. 6 indica que los efectos sinérgicos se observaron para las combinaciones de CL y OXY en proporciones 1:1 y 1:10. Por otro lado, la combinación de CL y OXY a 1:3 sólo proporcionó un efecto aditivo simple, pero no sinérgico.

Estos resultados sugieren que el efecto sinérgico entre el agonista β 3-ARCL y el agente antimuscarínico OXY también depende de la tasa de combinación particular en la combinación.

Ejemplo 6

Composición de Combinación de un Agonista β 3-AR y un Agente Antimuscarínico

Una composición de combinación de ejemplo que comprende un agonista β 3-AR y un agente antimuscarínico se muestra en la Tabla 8:

Tabla 8. Composición de Combinación de un Agonista β 3-AR y un Agente Antimuscarínico

Ingrediente ID	Composición,% por peso
Formulación CR	
Antimuscarínico	0.01-5
Agonista β 3-AR	0.1-10
Relleno	10-95
Aglutinante	0.1 -10
Lubricante	0.1-5
Recubrimiento CR	0,5 a 20

Colorante	0.1 -10
-----------	---------

Nota: El porcentaje por peso en la tabla 8 se basa en el peso total de la composición de combinación.

En una realización, el agonista β 3-AR se selecciona de los compuestos listados en la Tabla 3. En otra realización, el agente antimuscarínico se selecciona entre tolterodina, fesoterodina, oxibutinina, solifenacina, propiverina, trospio, imidafenacina, y TD6301.

En una realización, la composición de combinación anterior es una formulación de liberación controlada (LC). En otra realización, la composición de combinación es en forma de un gel de cápsula para administración oral.

Ejemplo 7

Composición de Combinación que Comprende Agente Antimuscarínico CR y Agonista β 3-AR IR

Una composición de combinación de ejemplo que comprende un agente antimuscarínico en una porción de liberación controlada (CR) y un agonista β 3-AR en una porción de liberación inmediata (IR) se muestra en la Tabla 9:

Tabla 9. Composición de Combinación de un Agonista β 3-AR y un Agente Antimuscarínico

Ingrediente ID	Composición, % por peso
Perlas CR de Agente Antimuscarínico	
Antimuscarínico	0.01-5
β 3-AR agonista	0.1-10
Relleno	10-95
Carpeta	0.1 -10
Lubricante	0.1-5
CR recubrimiento	0,5 a 20
Colorante	0.1 -10
Ingrediente ID	Composición,% en peso
CR gotas de antimuscarínico	
Antimuscarínico	0.01-5
Relleno	1-95

Aglutinante	0.1 - 10
Lubricante	0.1 - 5
Recubrimiento CR	0,5 - 20
Colorante	0.1 - 10
Perlas IR de Agonista β3-AR	
Agonista β3-AR	0.1 a 10
Relleno	1-95
Aglutinante	0.1 -10
Lubricante	0.1-5
Recubrimiento IR	0.5 - 20
Colorante	0,1 a 10

Nota: El porcentaje por peso (% por peso) en la tabla 9 se basa en el peso total de cada porción respectiva de la composición de combinación.

En una realización, el agonista β3-AR se selecciona a partir de los compuestos listados en la Tabla 3. En otra realización, el agente antimuscarínico se selecciona de tolterodina, fesoterodina, oxibutinina, solifenacina, propiverina, trospio, imidafenacina, y TD6301.

En una realización, la composición anterior se encuentra en un gel de cápsula para administración oral.

Ejemplo 8

Efecto de la Terapia Combinada en la Capacidad de la Vejiga en los Monos Rhesus

Materiales y Métodos

Se utilizaron monos rhesus hembra (Macaca mulatta) con pesos de 5.3-6.2 kg (4-7 años de edad). Los sujetos fueron alojados por parejas o de manera individual en un ciclo de 12 h de luz/12h de oscuridad (la luz se encendió a las 7:00 AM). Su dieta consistió en 2050 Teklad (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) y frutas frescas o vegetales. El agua estaba libremente disponible. Todos los animales fueron observados diariamente por un técnico de veterinaria y cuidadores para detectar signos de mala salud. Los sujetos fueron utilizados en varias ocasiones con> 13 días de periodo de descanso. Los monos fueron anestesiados con una inyección intramuscular de bien sea

Telazol (3-5 mg/kg) o ketamina (10-20 mg/kg) seguida de una infusión intravenosa de tasa constante con ketamina (0.2 a 0.8 mg/kg/min) usando una bomba de jeringa (552222, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Los animales fueron colocados en una posición supina y se introdujo un catéter transuretral de balón de triple luz (7,4 Fr, Cook Medical, Bloomington, IN) en la vejiga y el globo se infló con 1 ml de agua para asegurar la punta del catéter en la base de la vejiga. El catéter se conectó a una bomba de infusión (Gemini PC-2TX, Alaris Medical Systems, San Diego, CA) para el llenado de la vejiga y un transductor de presión para control de la presión intravesical. La presión intravesical se registró continuamente utilizando un sistema de adquisición de datos multicanal (Power lab, AD Instruments, Biopac systems, Colorado Springs, CO) a una tasa de muestreo de 20 Hz. Después de confirmar el vaciado la vejiga por ultrasonografía (Logiq e vet, GE Medical Systems, Waukesha, WI, Fig. 1 A), solución salina fue infundida por vía intravesical a 15 ml/min. Cuando se observó un aumento brusco de la presión indicativo del reflejo de la micción, la infusión intravesical se detuvo y la vejiga se vació manualmente con una jeringa de 60 ml. Después de dos lecturas de cistometría de referencia, el fármaco se administró por vía intravenosa tres veces usando un paradigma de dosis crecientes con una cistometría realizada 10 minutos después de cada dosis. La capacidad vesical se midió para cada cistometría y el porcentaje de cambio desde la capacidad de referencia se calculó. Tal como se usa en la presente, el término "capacidad básica" o "referencia", se refiere a la capacidad promedio de la vejiga a partir de dos mediciones pre-dosis.

Mono-terapias ya sea utilizando la tolterodina ("TOL"), darifenacina (DAR ") o el compuesto 14 (Cdp 14") con varias dosis y terapias de combinación de TOL: Compuesto 14 y DAR: Compuesto 14 en diferentes dosis y proporciones de dosis como se muestra en Tabla 10 fueron probadas en monos rhesus.

Tabla 10. Dosis y Proporciones de Dosis de Mono-Terapias y Terapias Combinadas

		Proporción de Dosis						
		Compuesto 14 (mg/kg)						
	Dosis	0 (vehículo)	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1
Tolterodina	0(vehículo)	Vehículo	Mono	Mono	Mono	Mono	Mono	Mono
(mg/kg)	0.01	Mono	3.3:1	1:1				

	0,03	Mono	10:1	03:1	1:1			
		Mono			3.3:1	1:1		1:10
Darifenacina (mg/kg)	0.01	Mono		1:1	1:3			
	0.03	Mono			1:1	1:3.3		
		Mono				1:1	1:3	

Usando las mono-terapias y terapias de combinación anteriores, los resultados de la capacidad de la vejiga en los monos rhesus se resumen en la Tabla 11. Los resultados reportados son valores promedio del cambio porcentual a partir del punto de referencia en 4-6 animales.

Tabla 11. Resultados de la Capacidad de la Vejiga usando Mono-Terapias y Terapias Combinadas en Monos Rhesus

		La capacidad vesical Medida en Cambio Porcentual a Partir del Punto de Referencia						
		Compuesto 14 (mg/kg)						
		0(vehículo)	0.003	0.01	0.03	0.1	0.3	1
TOL (mg/kg)	0 (Vehículo)	-0,13%	4,1%	18,0%	27,3%	33,9%	31%	55,9%
	0,01	8,6%	28,2%	31,0%				
	0,03	16,8%	35,5%	36,4%	43,5%			
	0.1	40,3%			62,9%	56,8%		69,6%
DAR (mg/kg)	0,01	8,9%		13,7%	23,7%			
	0,03	18,3%			37,1%	43,3%		

	0.1	29,4%				58,0%	68,7%	

Se puede ver en la Tabla 11 que todas las combinaciones del Compuesto 14 y tolterodina probadas mostraron una mayor capacidad de la vejiga, en comparación con cada mono-terapia respectiva. Es de señalar que con la dosis más baja de compuesto 14 (0,003 mg/kg), los efectos sinérgicos de las combinaciones fueron mucho más grandes. En concreto, la combinación del Compuesto 14: TOL a 0.003 mg/kg: 0.01 mg/kg, mostró aumento de la capacidad de la vejiga del 28,2% en comparación con el 4,1% y 8,6% para las respectivas mono-terapias. De manera similar, la combinación del Compuesto 14: TOL a 0,003 mg/kg: 0.03 mg/kg, mostró aumento de la capacidad de la vejiga de 35.5% en comparación con 4,1% y 16,8% para las respectivas mono-terapias.

Para terapias de combinación del Compuesto 14 y darifenacina, las combinaciones mostraron efecto superior de capacidad de la vejiga con dosis más altas de darifenacina (0.03, 0.1 mg/kg).

Tolterodina, un antagonista muscarínico no selectivo, claramente demostró eficacia mejorada con el Compuesto 14 en las combinaciones examinadas, mientras que la eficacia adicional con combinaciones de darifenacina, un antagonista M₃selectivo, y el Compuesto 14 se limitó sólo a dosis más altas. Estos resultados sugieren que tanto el antagonismo M₂ y M₃ de un agente antimuscarínico puede ser importante para la eficacia mejorada cuando se combina con un agonista β₃-AR.

Mientras la invención ha sido descrita e ilustrada con referencia a ciertas realizaciones particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que diversos cambios, modificaciones y sustituciones se pueden hacer en ella sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por ejemplo, las dosificaciones eficaces distintas de las dosificaciones particulares que se mencionan anteriormente en la presente pueden ser aplicables como una consecuencia de variaciones en la capacidad de respuesta del mamífero en tratamiento para cualquiera de las indicaciones de los agentes activos utilizados en la presente invención como se indicó anteriormente. Asimismo, las respuestas farmacológicas específicas observadas pueden variar de acuerdo con y dependiendo del compuesto activo particular seleccionado o si hay presentes

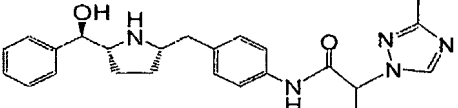
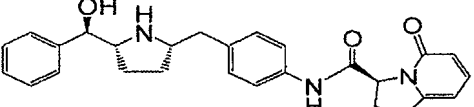
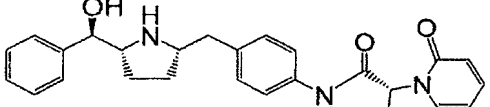
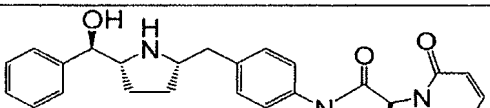
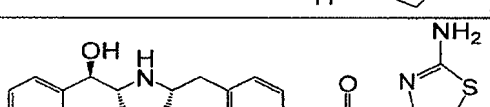
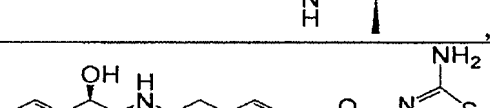
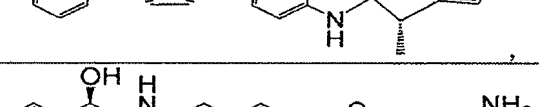
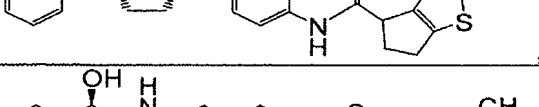
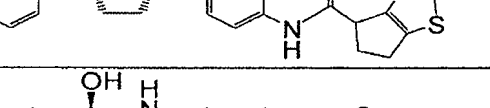
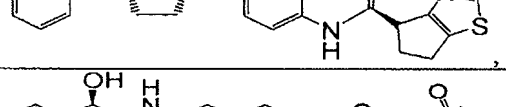
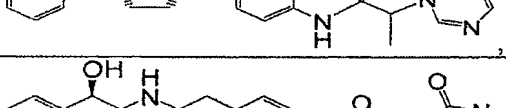
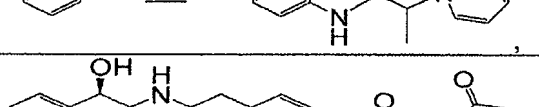
vehículos farmacéuticos, así como el tipo de formulación empleada, y tales variaciones o diferencias esperadas en los resultados se contemplan de acuerdo con los objetivos y prácticas de la presente invención. Se pretende, por tanto, que la invención sea definida por el alcance de las reivindicaciones que siguen y que tales reivindicaciones se interpreten tan ampliamente como sea razonable.

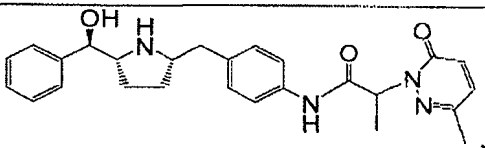
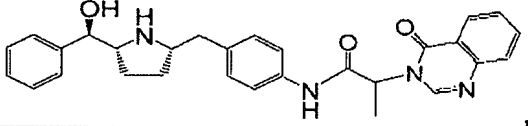
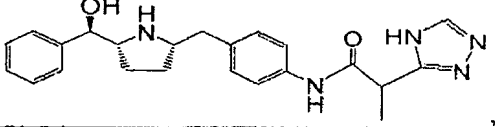
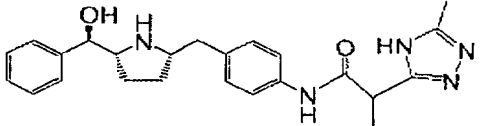
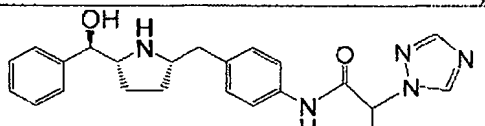
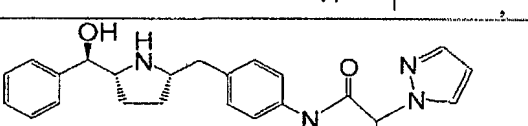
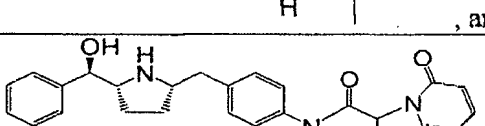
REIVINDICACIONES

1. Un método de tratamiento de la hiperreflexia vesical, donde el método comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo:
- un agonista $\beta 3$ -AR,
 - un agente antimuscarínico, y
 - un antagonista M_2 selectivo opcional;
- en donde el agonista $\beta 3$ -AR se selecciona del grupo constituido por:

Compuesto #	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

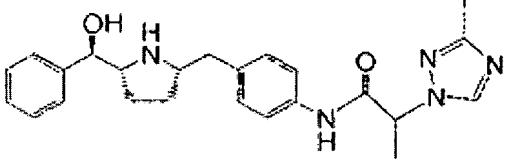
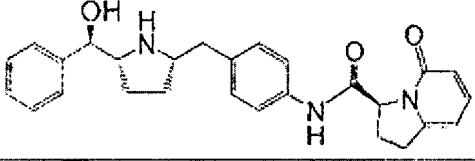
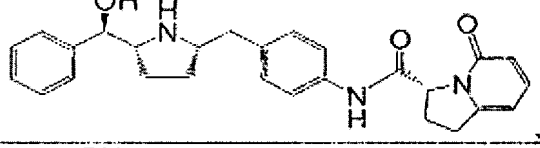
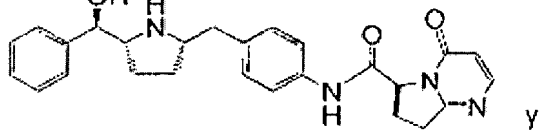
88

11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	

2. El método de la reivindicación 1, donde el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 de menos de 40.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 menor de 20.
4. El método de la reivindicación 2, en donde el agente antimuscarínico se selecciona del grupo que consiste en: tolterodina, fesoterodina, oxibutinina, solifenacina, propiverina, trospio, imidafenacina, y TD6301.
5. El método de la reivindicación 4, donde el agente antimuscarínico es tolterodina u oxibutinina.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista β 3-AR se selecciona del grupo que consiste de:

Compuesto #	Estructura
11	
12	
13	
14	

7. El método de la reivindicación 6, en donde el agonista β 3-AR y el agente antimuscarínico se administran al paciente en una proporción por peso de 300:1 a 1:10.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el agente antimuscarínico es tolterodina, y en donde el agonista β 3-AR y tolterodina se administran al paciente en una proporción por peso de 300:1 a 1:1.

9. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende administrar al paciente:

- un agonista β 3-AR,
- un agente antimuscarínico, y
- un antagonista M_2 selectivo.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el agente antimuscarínico tiene una proporción M_2/M_3 mayor de 40.

11. El método de la reivindicación 10, donde el agente antimuscarínico es darifenacina y el antagonista M₂selectivo es metoctramina.

12. Un método de tratamiento de la hiperreflexia vesical, en donde el método comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo:

CL316243, y

oxibutinina;

en donde CL316243 y oxibutinina se administran al paciente en una relación por peso de 1:1 o 1:10.

13. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista β 3-AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M₂ selectivo opcional se administran de manera simultánea, separada o secuencial.

14. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista β 3-AR, el agente antimuscarínico, y el antagonista M₂ selectivo opcional se administran por vía oral.

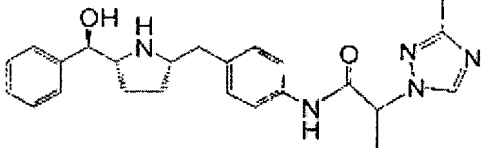
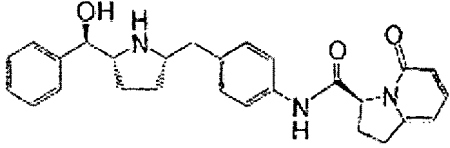
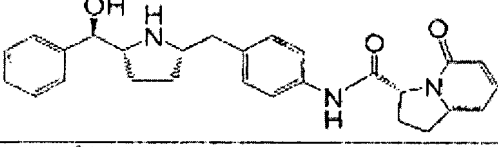
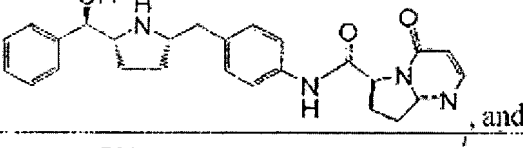
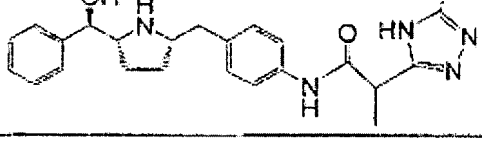
15. Una composición farmacéutica que comprende:

un agonista β 3-AR,

un agente antimuscarínico, y

un antagonista M₂ selectivo opcional;

en donde el agonista β 3-AR se selecciona del grupo constituido por:

Compuesto #	Estructura
11	
12	
13	
14	 and
26	

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde la composición comprende:

un agonista β 3-AR, y

un agente antimuscarínico; y

en donde el agente antimuscarínico tiene una relación M_2/M_3 menor de 40.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, en donde el agente antimuscarínico se selecciona del grupo que consiste en: tolterodina, oxibutinina, fesoterodina, solifenacina, propiverina, y trospio.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, donde la composición comprende:

un agonista β 3-AR,

un agente antimuscarínico, y

un antagonista M_2 selectivo;

en donde el agente antimuscarínico es darifenacina, y

en donde el antagonista M_2 selectivo es metoctramina.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, donde la composición es un comprimido o cápsula para administración oral.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde la composición proporciona una liberación controlada del agente antimuscarínico.

Diagrama de Análisis Isobolográfico

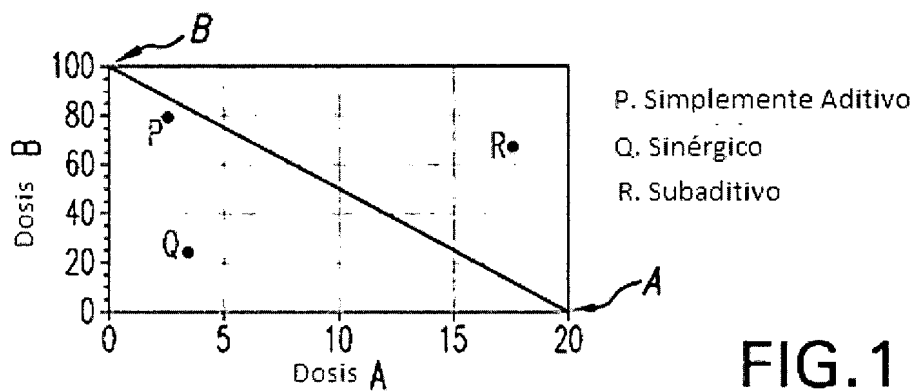


FIG.1

Isobologramas de la Inhibición de la contracción del detrusor inducida por las combinaciones de CL316243 con tolterodina

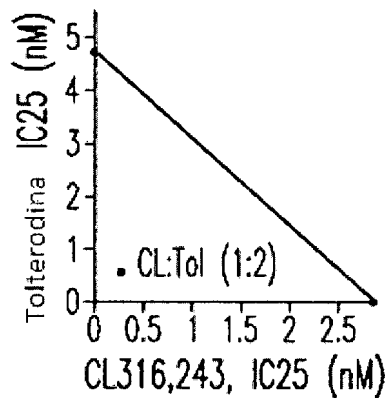


FIG.2A

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las Combinaciones de CL316243 con oxibutinina

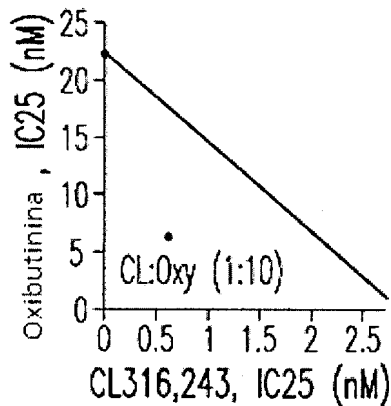


FIG.2B

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las
Combinaciones de CL316243 con Darifenacina

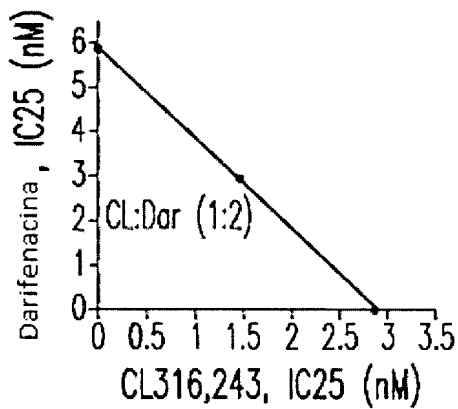


FIG.2C

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las
Combinaciones del Compuesto 12 y Tolterodina

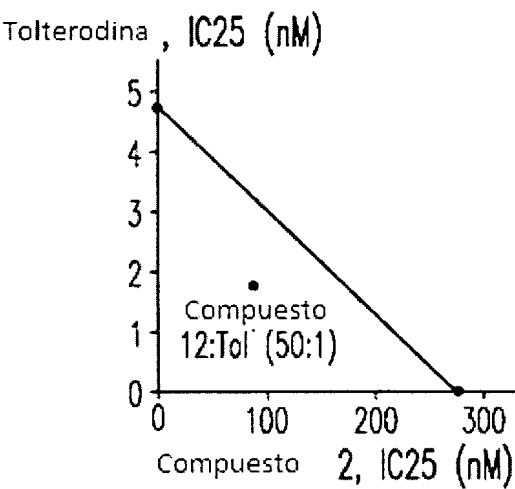


FIG.3A

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las
Combinaciones del Compuesto 12 y Darifenacina

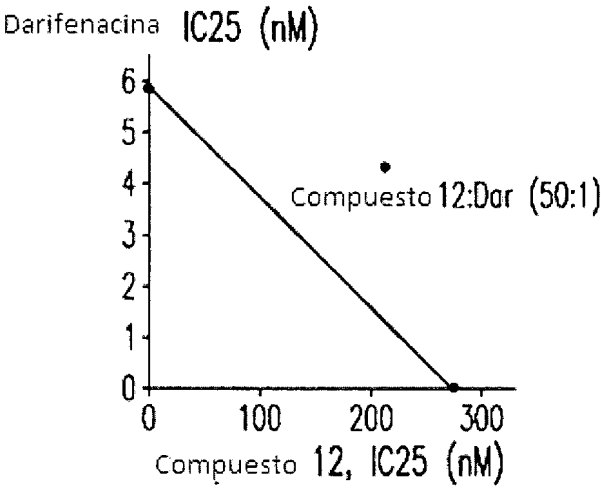


FIG.3B

CL316243 Sin Tratar (Círculo) y CL316243 Pre-Tratada (Puntos) con Metoctramina

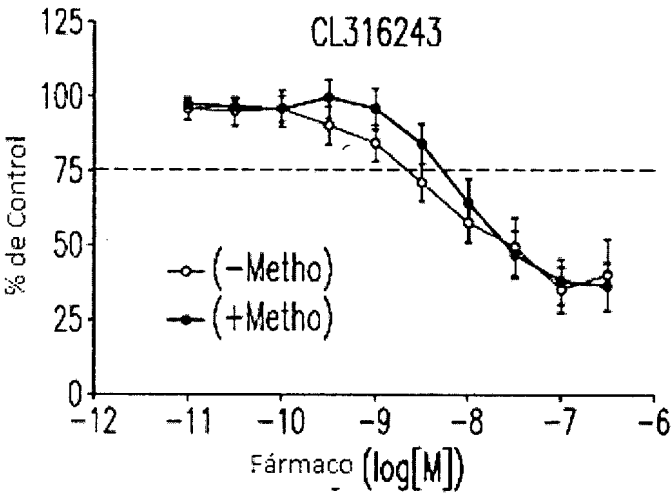


FIG.4

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las
Combinaciones de darifenacina y CL316243 sin tratar

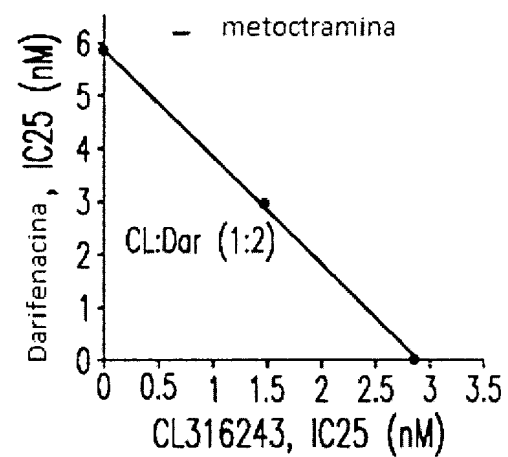


FIG.5A

Isobologramas de la Inhibición de la Contracción del Detrusor Inducida por las
Combinaciones de CL316243 pre-tratado con metoctramina

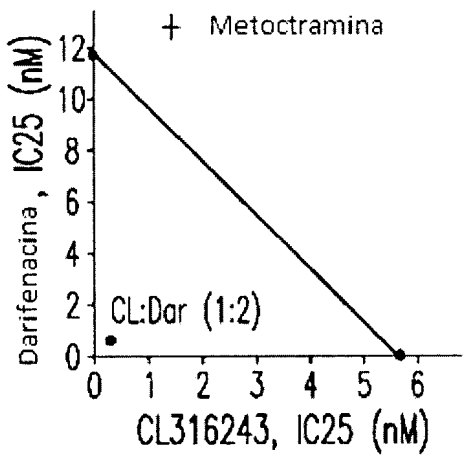


FIG.5B

Efecto de Proporciones de Combinación sobre el Efecto Sinérgico de la Terapia de
Combinación

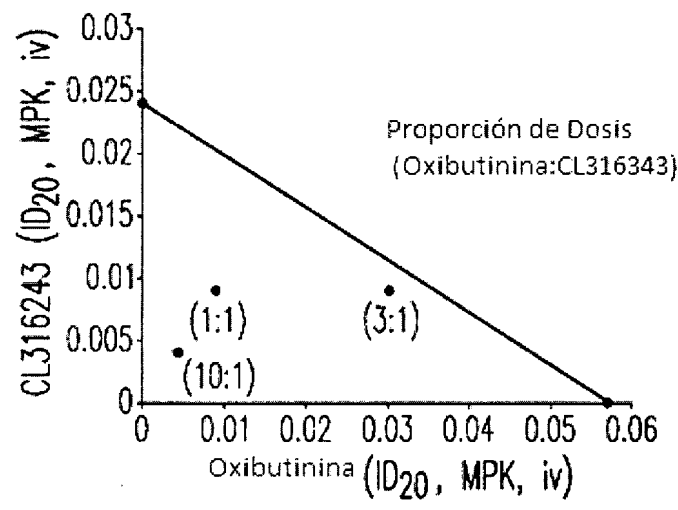


FIG.6

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MRLBRE00020	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 10/50328	International filing date (day/month/year) 27 September 2010 (27.09.2010)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07 October 2009 (07.10.2009)
Applicant MERCK SHARP & DOHME CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/50328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A01N 57/00 (2010.01)

USPC - 514/79

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC: 514/79

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 514/71, 49, 273, 773, 457, 256, 257, 255.01 (text search) Find search terms below

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar, Patentscope, SureChem
beta 3 adrenergic agonist, beta-adrenergic, modulat\$, stimulat\$, antimuscarinic, hydroxymethyl, pyrrolidine, 2-pyrrolidinemethanol, amide, benzamide, overactive bladder, urinary incontinence, tolterodine, oxybutynin, CL316243, methoctramine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0248979 A1 (BRETTMAN et al.) 09 December 2004 (09.12.2004) para [0017], [0020], [0227]-[0228], [0262], [0272]	12
Y	US 6,291,491 B1 (WEBER et al.) 18 September 2001 (18.09.2001) col 21, ln 25-35; col 12, ln 39-64	1-11, 13-20
Y	US 6,413,984 B1 (PHILIPPO et al.) 02 July 2002 (02.07.2002) col 9-10, Table 1; col 18, ln 63 to col 19, ln 6	1-11, 13-20
Y	OHTAKE et al. 'Pharmacological Characterization of a New Antimuscarinic Agent, Solifenacin Succinate, in Comparison with Other Antimuscarinic Agents', Biol. Pharm. Bull. 2007, Vol 30(1) pages 54-58. pg 56, Table 1, para 2-3; pg 57, Table 2; pg 57, para 1 to pg 58, para 1; pg 58, para 3-4	1-11, 13-20
Y	US 2004/0122014 A1 (MAMMEN et al.) 24 June 2004 (24.06.2004) para [0009], [0070], [0208]-[0209], [0218], [0259], [0265]	9-11, 14, 18, 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 November 2010 (07.11.2010)

Date of mailing of the international search report

18 NOV 2010

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774



No. 12-056870- -00000-0000

Fecha: 2012-04-04 15:15:28 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 93

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

LO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de Identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐