

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-087160- -00000-0000

Fecha: 2007-08-24 17:25:49 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 110

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

26/09/2007

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **LG LIFE SCIENCES LTD.**
 sociedad constituida y existente bajo las
 leyes de Corea.

Dirección: LG Twin Tower,
 East Tower,
 20 Yoido-dong,
 Youngdeungpo-gu,
 Seúl 150-010,
 Corea

Domicilio: Youngdeungpo-gu,
 Seúl,
 Corea

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
 Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
 Teléfono: 347 36 11
 Fax: 211 86 50
 E-mail: clientes@cavelier.com
 Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Hyun Ik SHIN**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

3. **Tae Ho HEO**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

5. **Jae Hoon LEE**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

2. **Hyeong Wook CHOI**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

4. **Kyu Woong LEE**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

6. **Ki Sook PARK**
 R&D Park,
 LG Life Sciences Ltd,
 104-1, Moongi-dong,
 Yuseong-gu,
 Daejeon 305-380,
 República de Corea

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/KR2006/000576Publicación Internacional No. WO 2006/090997 A1Fecha: 21 de febrero de 2006Fecha: 31 de agosto de 2006

6	Título (54) <u>DERIVADOS DE ISOXAZOLINA Y UN PROCESO NOVEDOSO PARA SU PREPARACION</u>		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07D 413/012</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>KR</u>	(32) Fecha <u>26 de febrero de 2005</u>
			(31) Número de Solicitud <u>10 2005 0016203</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>07-64,950</u>		Fecha: <u>13 de agosto de 2007</u>
10	Anexos:		
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.oo.		
☐	Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
☒	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.		
☒	Poderes, si fuere el caso.		
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
☐	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 efectuado por la IPEA.		
☐	Traducción del examen preliminar 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 12x12		
☐	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.		
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/090997 A1

Descripción:

Páginas 23 en el idioma original

Páginas 43 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 2

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

9



CONSULADO DE COLOMBIA

13548
3488

No. 387

30 JUL 2003

El suscrito Cónsul de Colombia en Seúl, Corea, vistos los documentos presentados por lo interesados, CERTIFICA:

Que el señor *Paik Seung Hun* quien como Notario Público de Seúl, Corea autentificó la firma del signatorio del poder precedente, ejercía a la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que la compañía *LG LIFE SCIENCES LTD*, es una Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de República de Corea y cumple su objeto conforme a las mismas: que el Señor *Heung Joon Yang*, quien en su carácter de *Presidente* de la citada compañía confiere el poder precedente y cuya firma fue autenticada ante el notario arriba citado, es su representante legal en este país.

El Cónsul no asume responsabilidad por el contenido del documento.

[Signature]

ALVARO ENRIQUE AYALA MELENDEZ

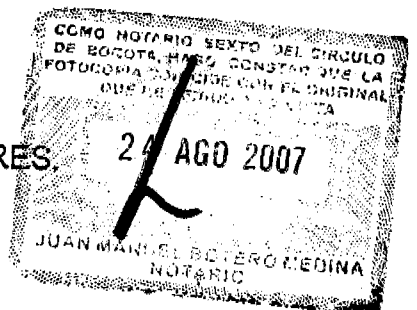
Cónsul de Colombia



Esta certificación es válida para un documento de (4) páginas.

PAGADOS IMPUESTOS DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES.

Valor: 23.00 dólares americanos



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

208440
Alvaro Ayala
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 FEB 26 P 2:25

REF. DE CALIFICACIONES
BOGOTÁ D.C.

6
6



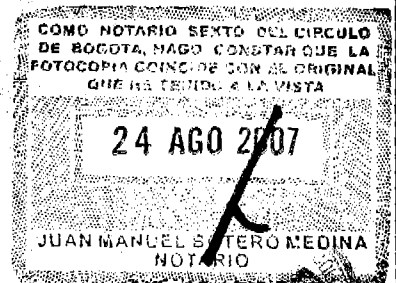
서울 강남구 역삼동 825-33
테헤란빌딩 8층

공증
인가 법무법인 한결

(02)3487-3500

Registered No.2003-1980

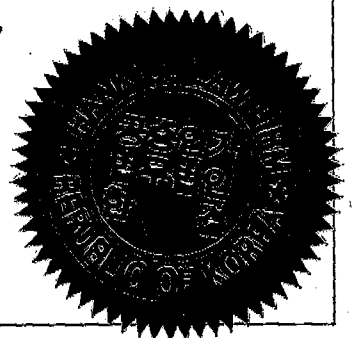
NOTARIAL CERTIFICATE



HANKYUL LAW FIRM & NOTARY OFFICE

#825-33, YOKSAM-DONG, KANGNAM-GU,

SEOUL, KOREA



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
LG LIFE SCIENCES LTD.

domiciliado (s) en/of 20, Yoido-dong, Yangdungpo-ku,
150-010 Seoul, KOREA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72 35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate,

promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan suscribir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

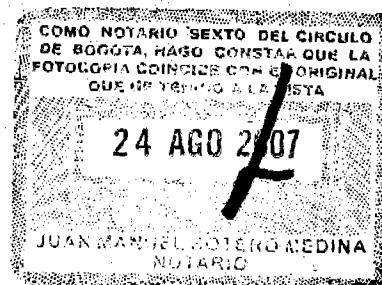
admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this July 15, 2003
en/in Seoul, Korea
por/by _____

Firma LG LIFE SCIENCES LTD.
President : Heung Joon YANG

Signature

Heung Joon Yang



서울 강남구 역삼동 825-33
태해란빌딩 8층

공증 법무법인 한 결

(02)3487-3500

등부 2003 년 제 1980 호

Registered No. 2003-1980

NOTARIAL CERTIFICATE

인 증

위 위 임 장 -----

Kyu Hyung LEE

attorney-in-fact of
LG LIFE SCIENCES LTD.

에 기재된 주식회사 엘지생명과학

PRESIDENT Heung Joon YANG

대표이사 양 흥 준 -----

appeared before me and

의 대리인 ----- 이 규 형은(는)

admitted said principal's

본직의 면전에서 위 본인이 서명날인

subscription to the

한 것임을 자인하였다.

attached POWER OF ATTORNEY.

2003 년 7 월 29 일

This is hereby attested

이 사무소에서 위 인증한다.

on this 29th day of Jul., 2003
at this office.

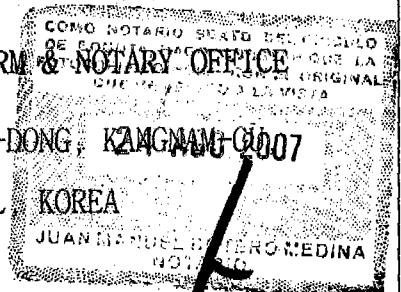
공증 법무법인 한 결

HANKYUL LAW FIRM & NOTARY OFFICE

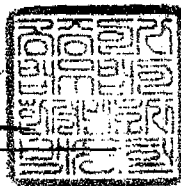
서울 강남구 역삼동 825-33

825-33, YOKSAM-DONG, KANGNAM-GU 007

SEOUL KOREA



1m 3 8



Baib Samplen

공증 담당변호사

Attorney at Law acting as Notary Public

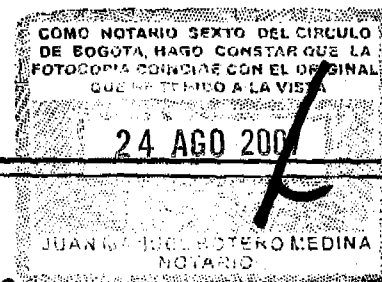
This office has been authorized by the
Minister of Justice, Republic of Korea, to
act as Notary Public since 2000. 09. 30
under Law No. 3790.

10
10

CERTIFICATE OF BUSINESS REGISTRATION
(Juridical person)

Registration Number: 107-86-21066

1. Name of Business: LG LIFE SCIENCES LTD.
2. Name of Representative: Heung Joon YANG
3. Starting Date of Biz.: August 1, 2002
4. I. D. Number: 110111-2581183
5. Place of Business: 20, Youido-Dong, Youngdungpo-Gu, Seoul, Korea
6. Place of Head Office: 20, Youido-Dong, Youngdungpo-Gu, Seoul, Korea
7. Kind of Business: Business: Manufacturing
Kind: Medicines, Farming drugs
8. Issuing Purpose: New Juridical person



Dated July 26, 2002

/S/ Official Seal Affixed

Head Officer
Youngdungpo Tax Office



11
11

사업자등록증

(법인사업자)

등록번호 : 107-86-21066

법인명(단체명) : (주) 엘지생명과학

대표자 : 양홍준

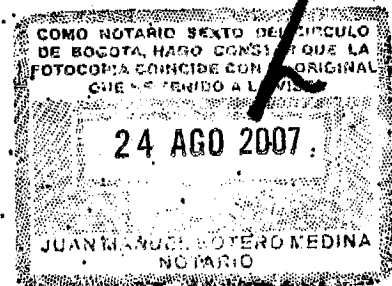
개업년월일 : 2002년 08월 01일 법인등록번호 :

사업장소재지 : 서울특별시 영등포구 여의도동 20

본점소재지 : 서울특별시 영등포구 여의도동 20

사업의종류 :  제조업  화학의약품

교부사유 : 신규법인



2002년 07월 26일

영등포세무서장



12
12

TRADUCCIÓN OFICIAL 047/2004 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL LG LIFE SCIENCES LTD., EMPRESA DOMICILIADA EN 20, YOIDO-DONG, YONGDUNGPO-KU, 150-010, SEÚL, COREA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EN SEÚL, COREA EL 15 DE JULIO DE 2003. FIRMADO: LG LIFE SCIENCES LTD PRESIDENTE: HEUNG JOON YANG NÚMERO DE REGISTRO 2003-1980

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

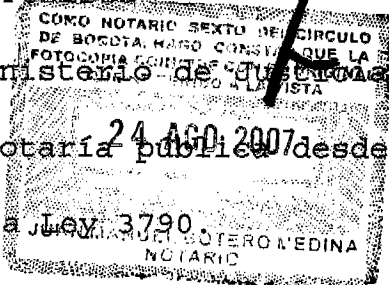
KYU HYUNG LEE, apoderado de LG LIFE SCIENCES LTD., PRESIDENTE HEUNG JOON YANG, compareció ante mi y admitió haber firmado como principal el poder adjunto.

Se atestigua hoy 29 de julio de 2003 en esta oficina.

OFICINA JURÍDICA Y NOTARIAL HANKYUL, 825-33, YOKSAM-DONG, KANGNAM-GU, SEÚL, COREA.

FIRMADO: APODERADO QUE ACTÚA COMO NOTARIO PÚBLICO

Esta oficina ha sido autorizada por el Ministerio de Justicia de la República de Corea, para actuar como notaría pública desde el 30 de septiembre de 2000, de acuerdo con la Ley 3790



CERTIFICACIÓN DE REGISTRO COMERCIAL

(PERSONA JURÍDICA)

NÚMERO DE REGISTRO: 107-86-21066

1. NOMBRE DE LA EMPRESA: LG LIFE SCIENCES LTD
2. NOMBRE DEL REPRESENTANTE: Heung Joon YANG

- 123
13
3. FECHA DE INICIACIÓN DE NEGOCIOS: 1 de agosto de 2002
 4. NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN: 1101111-2581183
 5. LUGAR DE NEGOCIOS: 20, YUJIDO-DONG, YOUNGDUNGPO-GU, SEÚL, COREA
 6. LUGAR DE OFICINA PRINCIPAL: 20, YUJIDO-DONG, YOUNGDUNGPO-GU, SEÚL, COREA
 7. TIPO DE NEGOCIOS: MANUFACTURA DE MEDICINAS Y DROGAS AGROPECUARIAS
 8. OBJETIVO DE LA EXPEDICIÓN: NUEVA PERSONA JURÍDICA

FECHADO EL 26 DE JULIO DE 2002

SELLO OFICIAL FIJADO: FIRMA

FUNCIONARIO PRINCIPAL

OFICINA TRIBUTARIA DE YOUNGDUNGPO

NÚMERO DE REGISTRO 2003-1980

CERTIFICADO NOTARIAL

OFICINA NOTARIAL Y DE FIRMA JURÍDICA HANKYUL

#825-33, YOKSAM-DONG, KANGNAM-GU, SEÚL, COREA

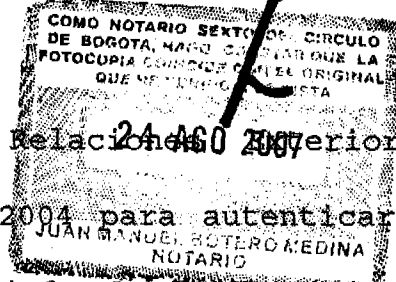
La firma y cargo de Paik Seung Hung se encuentran autenticados mediante diligencia 387 del 30 de julio de 2003 por el Consulado de Colombia en Seúl, Corea. Firmado: ALVARO ENRIQUE AYALA MELENDEZ, cónsul de Colombia.

Sello fijado por el Ministerio de Relaciones Exteriores, diligencia 208440 del 26 de febrero de 2004 para autenticar la firma de Alvaro Ayala. Firma ilegible, jefe de legalizaciones, Bogotá, D.C.

COLO-9281-706-003-1

WPCL0026 ID 3568

Bogotá, 27 de febrero de 2004.



Eduardo Calado
Eduardo Calado Noguera
"TRADUCTOR OFICIAL"
INGLES - ESPAÑOL
Res. 341 Febrero de 1994

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 August 2006 (31.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/090997 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 413/12 (2006.01)

PARK, Ki Sook [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR).

(21) International Application Number:

PCT/KR2006/000576

(74) Agent: CHOI, Kyu Pal; Halla Classic Building 4F, 824-11, Yeoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080 (KR).

(22) International Filing Date:

21 February 2006 (21.02.2006)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

10-2005-0016203

26 February 2005 (26.02.2005) KR

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

(71) Applicant (for all designated States except US): LG LIFE SCIENCES LTD. [KR/KR]; LG Twin Tower, East Tower, 20, Yoido-dong, Youngdeungpo-gu, Seoul 150-010 (KR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SHIN, Hyun Ik [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR). CHOI, Hyeong Wook [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR). HEO, Tae Ho [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR). LEE, Kyu Woong [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR). LEE, Jae Hoon [KR/KR]; R & D Park, LG Life Sciences Ltd., 104-1, Moongi-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 (KR).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ISOXAZOLINE DERIVATIVE AND NOVEL PROCESS FOR ITS PREPARATION

(57) Abstract: The present invention relates to an isoxazoline derivative having the cyclic carboxylic acid hemiketal moiety of formula (1) for use as caspase inhibitor, a process for preparing it, and a pharmaceutical composition comprising it.

WO 2006/090997 A1

15
15

Description

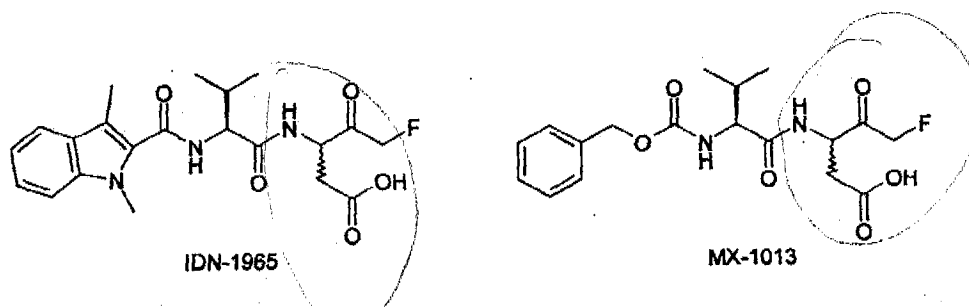
ISOXAZOLINE DERIVATIVE AND NOVEL PROCESS FOR ITS PREPARATION

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to an isoxazoline derivative having cyclic carboxylic acid hemiketal moiety for use as a caspase inhibitor, a process for preparing it, a pharmaceutical composition comprising it, and a use thereof.

BACKGROUND ART

Caspase inhibitor refers to a compound that can inhibit caspase activity, thereby regulating inflammation or apoptosis caused by caspase function. Among caspase inhibitors, irreversible inhibitor is known to show more effective inhibition activity since it irreversibly inactivates an enzyme to control apoptosis (Wu J. et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1999, 17, 320). The following compounds are known as irreversible inhibitor, and have 3-amino-5-fluoro-4-oxopentanoic acid moiety in common.



As diseases which can be treated or alleviated by administration of the above compounds, there are rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, graft vs. host disease, sepsis, osteoarthritis, osteoporosis, acute and chronic myelogenous leukemia, meningitis, salpingitis, septic shock, cholangitis, colitis, encephalitis, endocarditis, glomerulonephritis, hepatitis, myocarditis, pancreatitis, Type I diabetes mellitus, multiple sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, hepatocirrhosis, etc.

[References:

Dementia: Arch Neurol 2003 Mar; 60(3): 369-76, Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. Pompl PN, Yemul S, Xiang Z, Ho L, Haroutunian V, Purohit D, Mohs R, Pasinetti GM.;

Cerebral stroke: Proc Natl Acad Sci USA 2002 Nov 12; 99(23): 15188-93, Caspase

16
16

- activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC, Hyman BT, Yuan J, Kuida K, Flavell RA, Moskowitz MA.;
- [14] Brain impairment due to AIDS: J Neurosci 2002 May 15; 22(10): 4015-24, Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. Garden GA, Budd SL, Tsai E, Hanson L, Kaul M, D'Emilia DM, Friedlander RM, Yuan J, Masliah E, Lipton SA.;
- [15] Diabetes: Diabetes 2002 Jun; 51(6): 1938-48, Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ.;
- [16] Gastric ulcer: J Physiol Pharmacol 1998 Dec; 49(4): 489-500, Role of basic fibroblast growth factor in the suppression of apoptotic caspase-3 during chronic gastric ulcer healing. Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A.;
- [17] Cerebral injury by hepatitis: J Viral Hepat 2003 Mar; 10(2): 81-6, Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection. Forton DM, Taylor-Robinson SD, Thomas HC.;
- [18] Fulminant hepatic failure: Gastroenterology 2000 Aug; 119(2): 446-60, Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C.;
- [19] Sepsis: Nat Immunol 2000 Dec; 1(6): 496-501, Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE.;
- [20] Organ transplantation rejection: Xenotransplantation 2001 May; 8(2): 115-24, In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells. Fujino M, Li XK, Suda T, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Mikoshiba K, Guo L, Okuyama T, Enosawa S, Amemiya H, Amano T, Suzuki S.;
- [21] Rheumatoid arthritis: Prog Med Chem 2002; 39: 1-72, Caspase inhibitors as anti-inflammatory and antiapoptotic agents. Graczyk PP.;
- [22] Ischemic cardiac diseases: Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002 Sep; 283(3): H990-5, Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes. Todor A, Sharov VG, Tanhehco EJ, Silverman N, Bernabei A, Sabbah HN.;
- [23] Anti-inflammation: J Immunol 2003 Mar 15; 170(6): 3386-91, A broad-spectrum caspase inhibitor attenuates allergic airway inflammation in murine asthma model.

17

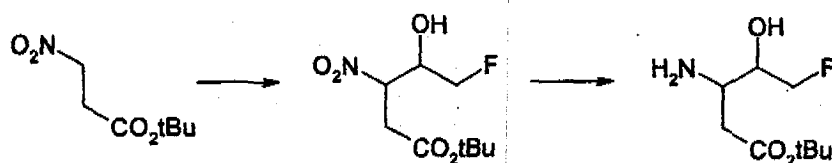
Iwata A, Nishio K, Winn RK, Chi EY, Henderson WR Jr, Harlan JM.;

- [24] Hepatocirrhosis: i) J Pharmacol Exp Ther. 2004 Mar; 308(3): 1191-6, The caspase inhibitor Idn-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. Canbay A., Fledstein A., Baskin-Bey E., Bronk FS. Gores GJ.; ii) Hepatology. 2004 Feb; 39(2): 273-8, Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. Canbay A, Friedman S, Gores GJ.; iii) Hepatology. 2003 Nov; 38(5): 1188-98, Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ.]

- [25] On the other hand, for 3-amino-5-fluoro-4-oxopentanoic acid moiety of caspase inhibitor, such preparation process as the following Reaction Scheme 1 (Revesz et al., *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 9693) is known in the art:

- [26] Reaction Scheme 1

- [27]



- [28]

- [29] **SUMMARY OF THE INVENTION**

- [30]

- [31] The present inventors have continued to study a compound that can be used as effective inhibitor of caspase, and a process for its preparation.

- [32] As a result, they discovered that the isoxazoline derivative having cyclic carboxylic acid hemiketal moiety according to the present invention has good caspase inhibition activity, and can be prepared in high purity by using crystallization-induced dynamic transformation, to complete the present invention.

- [33] Thus, one object of the present invention is to provide a compound of the following formula (1) with the structure of isoxazoline and cyclic carboxylic acid hemiketal moieties, and a novel process for effective preparation thereof.

- [34] Another object of the present invention is to provide an amine derivative of the following formula (4), an intermediate for the compound of the following formula (1), and a process for preparing it.

- [35] Another object of the present invention is to provide a pharmaceutical composition for treating inflammation or preventing apoptosis, comprising the compound of the following formula (1) and pharmaceutically acceptable carriers.

- [36] Another object of the present invention is to provide a method for treating in-

48
18

flammation or preventing apoptosis in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the compound of the following formula (1) to the subject.

[37] Another object of the present invention is to provide a use of the compound of the following formula (1) for the preparation of a medicament for treating inflammation or preventing apoptosis.

[38] Another object of the present invention is to provide a crystalline form of the compound of the following formula (1) having good stability.

[39]

[40] **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

[41]

[42] Fig. 1 is X-ray diffraction spectrum of the crystalline form of the compound of formula (1) (R^1 = isoquinolinyl, R^2 = isopropyl) according to the present invention.

[43] Fig. 2 is a graph showing stability test results of the crystalline form and amorphous form of the compound of formula (1) (R^1 = isoquinolinyl, R^2 = isopropyl) according to the present invention.

[44]

[45] **DISCLOSURE OF THE INVENTION**

[46]

[47] Some important terms used in the present invention can be defined as follows.

[48] In the formulas and reaction schemes used in the present invention, alkyl refers to linear or branched alkyl group consisting of 1 to 8 carbon atoms, or cycloalkyl group consisting of 3 to 10 carbon atoms.

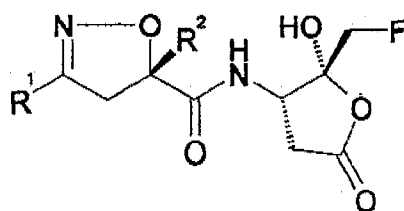
[49] Also, aryl includes all of aromatic group, heteroaromatic group, and partially reduced derivatives thereof. Said aromatic group refers to 5- to 15-membered unsaturated hydrocarbons in simple or fused cyclic form, and said heteroaromatic group refers to aromatic groups having 1 to 5 hetero atoms selected from the group consisting of oxygen, sulfur and nitrogen.

[50] Further, one or more hydrogens of said alkyl and said aryl may be substituted by other substituents. The examples of selectable substituents include acyl, amino, carboalkoxy, carboxy, carboxyamino, cyano, halo, hydroxy, nitro, thiol, alkyl, cycloalkyl, alkoxy, aryloxy, sulfoxy, guanido, etc.

[51]

[52] The present invention relates to an isoxazoline derivative having cyclic carboxylic acid hemiketal moiety of the following formula (1) for use as caspase inhibitor:

[53]



(1)

wherein

R¹ is alkyl or aryl, and

R² is alkyl.

Preferably,

R¹ is isoquinolinyl, quinolinyl or naphthyl, and

R² is methyl, ethyl, propyl or butyl.

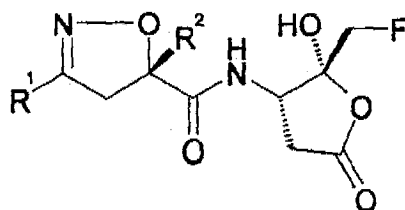
More preferably, R¹ is isoquinolinyl, and R² is isopropyl.

The compound of formula (1) wherein R¹ is isoquinolinyl and R² is isopropyl can exist as a crystalline form showing the following X-ray diffraction pattern

D (Å)	Relative strength(I/I ₀)	2θ Angle
9.665	0.555	9.15
7.284	0.397	12.15
5.825	0.260	15.21
5.563	0.228	15.93
5.372	0.302	16.5
4.840	1.000	18.33
4.695	0.477	18.9
4.341	0.454	20.46
3.663	0.230	24.3
3.414	0.219	26.1

Also, the present invention relates to a process for preparing the compound of formula (1), comprising:

(a) activating a compound of the following formula (2), then reacting it with a compound of the following formula (4) to produce a compound of the following

24
71

(1)

wherein,

R¹ is alkyl or aryl,

R² is alkyl,

R³ and R³ are each alkyl, or

R³ and R³ together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and

R⁴ is alkyl.

Preferably,

R¹ is isoquinolinyl, quinolinyl or naphthyl,

R² is methyl, ethyl, propyl or butyl,

R³ and R³ are each methyl, ethyl or propyl, or

R³ and R³ together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or dioxane, and

R⁴ is methyl, ethyl, propyl or butyl.

Each step of the above preparation process of the compound of formula (1) may be described in more detail as follows.

As an activation reagent to activate the compound of formula (2) in the above step (a), it is preferable to use one selected from the group consisting of oxalyl chloride, trimethylacetyl chloride, phosphoryl tri-chloride, and thionyl chloride.

Also, it is preferable that the reaction in the step (a) is carried out in the presence of base selected from the group consisting of triethylamine, tri(*n*-butyl)amine, diisopropylethylamine, pyridine, 4-dimethylaminopyridine and 4-(4-methyl-piperidine-1-yl)-pyridine, and it is preferable that the base is used in an amount of 1.0 to 10.0 equivalents to the compound of formula (2).

Moreover, it is preferable that the reaction in the step (a) is carried out in one or more solvents selected from the group consisting of dichloromethane, chloroform, tetrahydrofuran, dimethoxyethane, dioxane and ethyl acetate.

On the other hand, it is preferable that the compound of formula (4) in the step (a) is used in an amount of 1.0 to 3.0 equivalents to the compound of formula (2).

22
22

- [101] It is preferable that the hydrolysis in the step (b) is carried out in the presence of base selected from the group consisting of lithium hydroxide (preferably, anhydrous or monohydrate crystalline), sodium hydroxide, potassium hydroxide and calcium hydroxide, and it is also preferable that the base is used in an amount of 0.1 to 10.0 equivalents to the compound of formula (13).
- [102] Moreover, it is preferable that the reaction in the step (b) is carried out in one or more solvents selected from the group consisting of methanol, ethanol, *n*-propanol, isopropanol, tetrahydrofuran, dimethoxyethane, dioxane and dichloromethane, or in a mixed solvent of the solvent selected from the above group and water.
- [103] It is preferable that the deprotection reaction in the step (c) is carried out in the presence of acid selected from the group consisting of hydrochloric acid, sulfuric acid and trifluoroacetic acid, and it is preferable that the acid is used in an amount of 0.1 to 20.0 equivalents to the compound of formula (14).
- [104] Also, it is preferable that the deprotection reaction in the step (c) is carried out in the presence or absence of solvent selected from dichloromethane or chloroform.
- [105] The crystallization-induced dynamic transformation reaction in the step (d) can be carried out by adding the compound of formula (1) as seed, or carried out in the presence of seed and a catalytic amount of base, wherein the base is preferably an amine selected from the group consisting of triethylamine, tri(*n*-butyl)amine, diisopropylethylamine, diisopropylamine, pyridine, 4-dimethylaminopyridine, 4-(4-methyl-piperidine-1-yl)-pyridine, optically active 1-phenylethylamine, and optically active 1-naphthylethylamine.
- [106] In the step (d), it is preferable to use said amine in an amount of 0.001 to 1.0 equivalent to the compound of formula (14), and more preferable to use 0.03 to 0.5 equivalent. If the amount of used amine is too little, the reaction rate becomes slower, and if the amount is too much, the yield of the compound of formula (1) is decreased.
- [107] Further, it is preferable that the crystallization-induced dynamic transformation reaction in the step (d) is carried out in one or more solvents selected from the group consisting of toluene, benzene, dichlorobenzene, tetrahydrofuran, dimethoxyethane, dioxane, ethyl acetate, dichloromethane, acetonitrile, methyl *t*-butylether, and diethylether.
- [108]
- [109] Below, the process for preparing the compound of formula (1) according to the present invention will be explained in more detail with reference to Reaction Scheme 2.
- [110] The isoxazoline derivative of formula (2) having high optical activity is prepared according to the process disclosed in PCT/KR2004/002060 filed on August 17, 2004 by the present applicant, and then combined with the compound of formula (4) to

produce the compound of formula (13). Then, the compound of formula (13) is ester-hydrolyzed to produce the compound of formula (14), and the deprotection reaction of the ketal moiety of the compound of formula (14) is carried out to obtain a mixture of the compounds of formula (15) and formula (16), which is effectively transformed into the compound of formula (1) by selective dynamic crystallization.

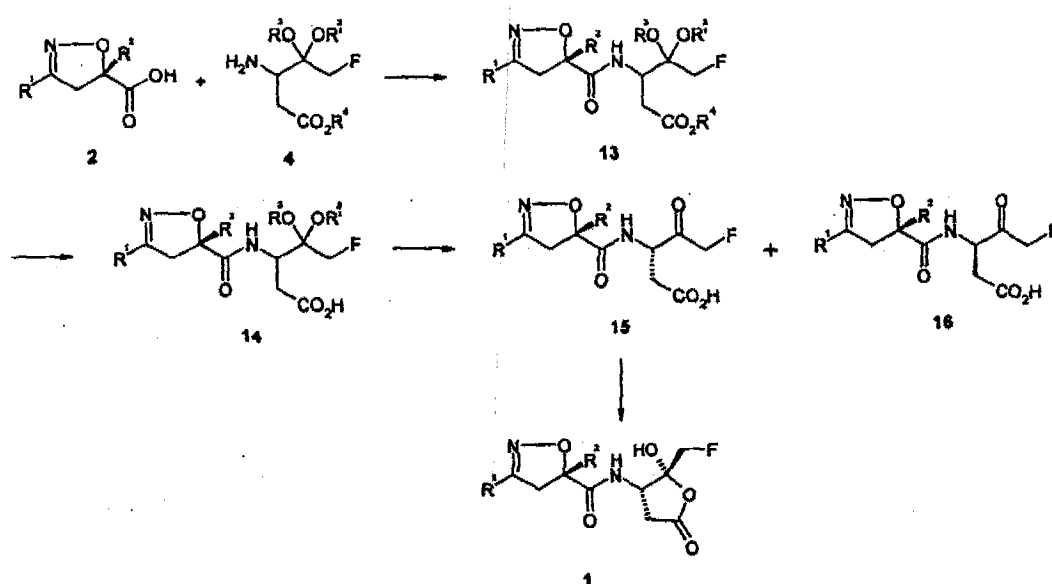
[111] In particular, if the mixture of the compounds of formula (15) and formula (16) is dissolved in organic solvent, and the seed of the compound of formula (1) is added to the solution, only the compound of formula (15) in the mixture is transformed into the compound of formula (1) to be isolated as solid.

[112]

[113]

Reaction Scheme 2

[114]



[115]

wherein,

[116]

R^1 is alkyl or aryl,

[117]

R^2 is alkyl,

[118]

R^3 and R^3 are each alkyl, or

[119]

R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and,

[120]

R^4 is alkyl.

[121]

[122]

Also, if the mixture of the compounds of formula (15) and formula (16) is treated with a catalytic amount of base together with seed, both the compound of formula (15) and the compound of formula (16) are transformed into the compound of formula (1), to produce the compound of formula (1) with higher yield (Reaction Scheme 3). The

24
24-

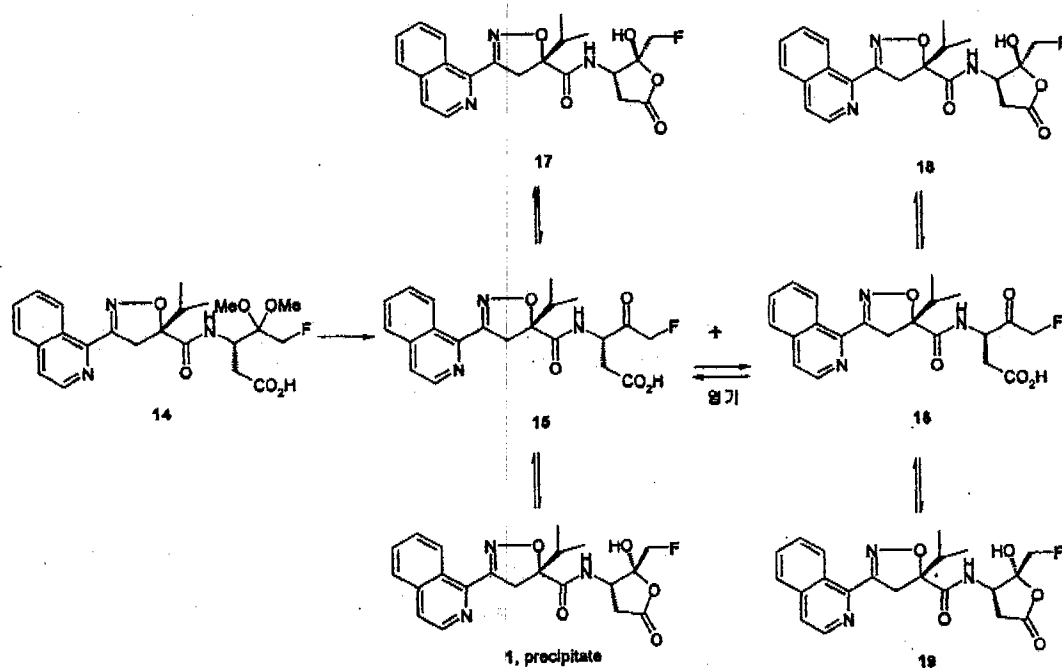
compound of formula (15) is in equilibrium with the compound of formula (16) due to the base present in solution. Also, the compound of formula (15) is in equilibrium with the compounds of formula (17) and formula (1), and the compound of formula (16) is in equilibrium with the compounds of formula (18) and formula (19). Among them, the compound of formula (1) having good crystallizing property selectively precipitates, and so the equilibrium of all the compounds moves to the compound of formula (1), thereby selectively giving only the compound of formula (1) with high yield from the mixture of the compounds of formula (15) and formula (16).

[123]

[124]

[125]

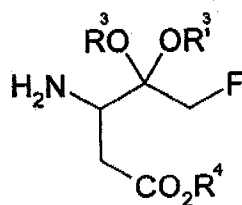
Reaction Scheme 3



[126]

Also, the present invention relates to a compound of the following formula (4), an intermediate used for the preparation of the compound of formula (1):

[127]



[128]

(4)

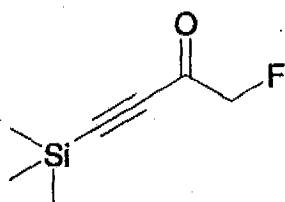
[129]

[130]

wherein

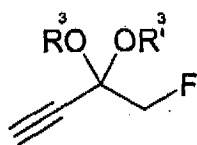
25
25

- [131] R^3 and R^3 are each alkyl, or
 [132] R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle,
 and
 [133] R^4 is alkyl.
 [134] Preferably,
 [135] R^3 and R^3 are each methyl, ethyl or propyl, or
 [136] R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or
 dioxane, and
 [137] R^4 is methyl, ethyl, propyl or butyl.
 [138]
 [139] Also, the present invention relates to a process for preparing the compound of
 formula (4), comprising:
 [140] (a) protecting and deprotecting a compound of the following formula (9) to
 produce a compound of the following formula (10);
 [141] (b) carrying out carbon-carbon coupling reaction of the compound of formula (10)
 to produce a compound of the following formula (11);
 [142] (c) reacting the compound of formula (11) with benzyl amine, and reducing it to
 produce a compound of the following formula (12); and
 [143] (d) hydrogenating the compound of formula (12);
 [144]



[145] (9)

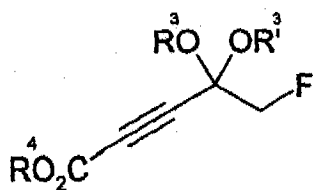
[146]



[147] (10)

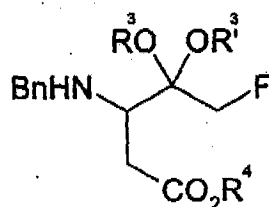
[148]

~~26~~
26



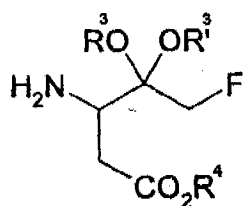
[149] (11)

[150]



[151] (12)

[152]



[153] (4)

[154]

[155] wherein

[156] R^3 and R^3 are each alkyl, or[157] R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and[158] R^4 is alkyl.

[159] Preferably,

[160] R^3 and R^3 each are methyl, ethyl or propyl, or[161] R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or dioxane, and[162] R^4 is methyl, ethyl, propyl or butyl.

[163]

[164] The above process for preparing the compound of formula (4) will be more specifically described below.

[165] In the step (a), it is preferable that the compound of formula (9) is protected by using trimethylorthoformate or triethylorthoformate, and the deprotection reaction is carried out in the presence of base selected from sodium hydroxide, potassium

27
27

hydroxide, sodium carbonate, and sodium hydrogen carbonate. Further, it is preferable that the base in the above deprotection reaction is used in an amount of 1.0 to 2.0 equivalents to the compound of formula (9).

[166] Also, it is preferable that the protection reaction in the step (a) is carried out in methanol or ethanol solvent, and the deprotection reaction is carried out in one or more solvents selected from the group consisting of methanol, ethanol, dichloromethane, chloroform, and water.

[167] Also, it is preferable that the reaction in the step (b) is carried out by using ethylchloroformate or methylchloroformate in the presence of base selected from *n*-butyllithium, lithiumdiisopropylamine or lithiumhexamethyldisilazide, and the base is used in 0.5 to 3.0 equivalents to the compound of formula (10), and said ethylchloroformate or methylchloroformate is used in 0.5 to 3.0 equivalents to the compound of formula (10).

[168] Also, it is preferable that the reaction in the step (b) is carried out in a solvent selected from the group consisting of tetrahydrofuran, ethyl ether, and methyl-*t*-butyl ether.

[169] It is preferable that the reduction reaction in the step (c) is carried out by using acetic acid and sodium borohydride, and said sodium borohydride is used in 1.0 to 5.0 equivalents to the compound of formula (11), and said acetic acid is used in 1.0 to 20.0 equivalents to the compound of formula (11).

[170] Also, it is preferable that said benzyl amine in the step (c) is used in 1.0 to 10.0 equivalents to the compound of formula (11).

[171] Further, it is preferable that the reaction in the step (c) is carried out in the presence or absence of solvent selected from ethyl acetate, tetrahydrofuran, ethylether and methyl-*t*-butyl ether, and may be carried out as one-pot reaction, if desired.

[172] It is preferable that the reaction in the step (d) is carried out in the presence of metal catalyst, more preferably palladium family catalyst or Raney nickel family catalyst. Specifically, palladium family catalyst having 1 to 20 wt% of palladium (Pd) or Raney nickel family catalyst having 1 wt% or more of Raney nickel, supported on a carrier selected from the group consisting of carbon, silica and alumina, may be used in an amount of 0.01 to 10 wt% based on its metal component to the compound of formula (12).

[173] Also, it is preferable that the reaction in the step (d) is carried out in one or more solvents selected from the group consisting of methanol, ethanol, *n*-propanol, isopropanol, tetrahydrofuran, dimethoxyethane, dioxane, ethyl acetate and dichloromethane.

[174] Further, it is preferable that the hydrogenation reaction in the step (d) is carried out at a temperature of 0 to 50°C and under a hydrogen pressure of 1 to 100 atm.

[175]

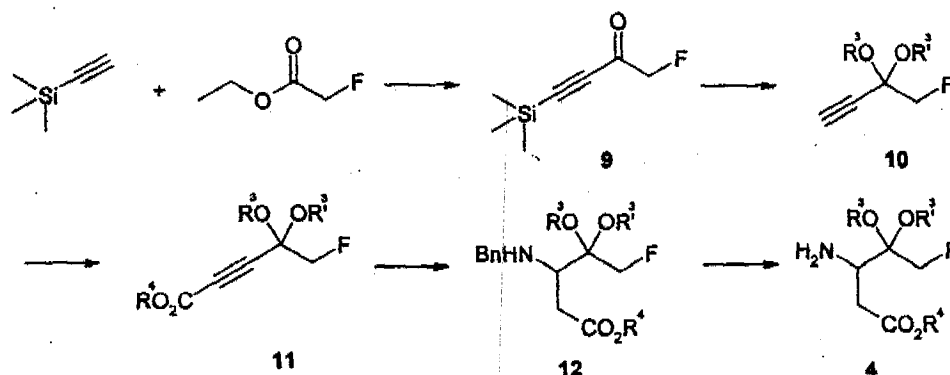
[176]

The present inventors have developed a novel process for preparing the compound of formula (4), an intermediate for the compound of formula (1), with higher yield, as illustrated in the following Reaction Scheme 4.

[177]

Reaction Scheme 4

[178]



[179]

wherein

[180]

R^3 and R^3 are each alkyl, or

[181]

R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and

[182]

R^4 is alkyl.

[183]

[184]

Also, the present invention relates to a pharmaceutical composition for treating inflammation or preventing apoptosis, comprising the compound of the above defined formula (1) and pharmaceutical acceptable carriers, specifically a pharmaceutical composition for treating dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

[185]

Also, the present invention relates to a method for treating inflammation or preventing apoptosis in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the compound of the above defined formula (1) to the subject, specifically a method for treating dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

29
29

- [186] Also, the present invention relates to a use of the compound of the above defined formula (1) for the manufacture of a medicament for treating inflammation or preventing apoptosis, specifically a medicament for treating dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.
- [187] The compound of formula (1) according to the present invention may be formulated into various pharmaceutical forms for administration purpose. To prepare the pharmaceutical composition according to the present invention, an effective amount of the compound of formula (1) is mixed with a pharmaceutical acceptable carrier that may take a wide variety of forms depending on the formulation to be prepared.
- [188] The compound of formula (1) may be formulated as a parenteral injection, or percutaneous or oral preparation depending on its application purpose. It is especially advantageous to formulate the composition in a unit dosage form for ease of administration and uniformity of dosage.
- [189] For the oral preparation, any usual pharmaceutical carrier may be used. For example, water, glycols, oils, alcohols and the like may be used for oral liquid preparations such as suspensions, syrups, elixirs and solutions; or starches, sugars, kaolin, lubricants, binders, disintegrating agents and the like may be used for solid preparations such as powders, pills, capsules and tablets. Due to their ease of administration, tablets and capsules are the most advantageous dosage unit forms. It is also desirable for tablets and pills to be formulated into enteric-coated preparation.
- [190] For the parenteral preparation, sterile water is usually used as the carrier, though other ingredients such as solubility aids may be used. Injections, for example, sterilized aqueous or oily suspension for injection, can be prepared according to the known procedure using suitable dispersing agent, wetting agent, or suspending agent. Solvents that can be used for preparing injections include water, Ringer's fluid, and isotonic NaCl solution, and sterilized fixing oil may also be conveniently used as the solvent or suspending media. Any non-stimulative fixing oil including mono-, di- glyceride may be used for this purpose. Fatty acid such as oleic acid may also be used for injections.
- [191] For the percutaneous preparation, the carrier may include a penetration enhancing agent and/or a suitable wetting agent, optionally combined with suitable additives having no significant skin irritation. Said additives may facilitate the administration through the skin and/or may assist preparation of a desired composition. These percutaneous preparations are administered via various manners, e.g., as a transdermal patch, a spot-on, or an ointment.

30
30

[192] When the compound of formula (1) is used for clinical purpose, it is preferably administered to the subject patient in an amount ranging from 0.1 to 100 mg per kg of body weight a day. The total daily dosage may be administered once or over several times. However, specific administration dosage for an individual patient can be varied with specific compound used, body weight, sex, hygienic condition, or diet of the subject patient, time or method of administration, excretion rate, mixing ratio of agent, severity of disease to be treated, etc.

[193]

[194] Hereinafter, the present invention will be described in more detail with reference to the following Examples, but the scope of the present invention should not be construed to be limited thereby in any manner.

[195]

[196] **Preparation Example 1**

[197] **1-Fluoro-4-trimethylsilyl-3-butyn-2-one (9)**

[198] 49.1 g (499 mmol) of trimethylsilyl acetylene was dissolved in 250 mL of anhydrous tetrahydrofuran, and the inner temperature was lowered to about -55°C, and then 210 mL (525 mmol) of 2.5 M *n*-BuLi in *n*-hexane was added thereto over about 25 minutes with maintaining the inner temperature below -30°C. After stirring for about 40 minutes, 52.9 g (499 mmol) of ethyl fluoroacetate was added to the reaction mixture over 5 minutes with maintaining the inner temperature below -25°C, and then 74.4 g (524 mmol) of BF₃·OEt was added thereto over 15 minutes with maintaining the inner temperature -55°C to -65°C. After finishing the addition, the reaction mixture was stirred at 20°C for 2 hours, and 250 mL of 10% ammonium chloride aqueous solution was added thereto to finish the reaction. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with 200 mL of ethylacetate. The combined organic phase was washed with 250 mL of brine, and concentrated under reduced pressure. The residue was distilled under vacuum at 10 mbar and 68°C to give the compound of formula (9) (67.3 g, 85%) as clear oil.

[199] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 4.90 (d, J = 47.1 Hz, 2H), 0.26 (s, 9H)

[200] ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 181.0 (d, J = 21.5 Hz), 104.0, 98.1, 84.8 (d, J = 187 Hz)

[201]

[202] **Preparation Example 2**

[203] **4-Fluoro-3,3-dimethoxy-1-butyne (10, R³, R³ = methyl)**

[204] 33.6 g (316 mmol) of trimethyl orthoformate and 6.0 g (31.5 mmol) of *p*-TsOH-H₂O together with 50.0 g (316 mmol) of the compound of formula (9) obtained from the Preparation Example 1 were put into 260 mL of methanol, and stirred at reflux temperature (inner temperature 60 ~ 64°C) for about 6 hours. The reaction mixture was

31

concentrated under reduced pressure to remove about 130 mL of solvent, and was diluted with 260 mL of methylene chloride. 130 mL of 10% aqueous sodium hydrogen carbonate solution was added thereto and layer-separated, and the water layer was extracted by using 130 mL of methylene chloride. The combined organic layer was concentrated under reduced pressure to give

4-fluoro-3,3-dimethoxy-1-trimethylsilylbutyne (59.0 g, 92%) as an intermediate, a precursor compound of the object compound (10). This compound was used in the next reaction without further purification.

[205] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 4.38 (d, J = 47.1 Hz, 2H), 3.40 (s, 6H), 0.20 (s, 9H)

[206]

[207] 59.0 g (289 mmol) of 4-fluoro-3,3-dimethoxy-1-trimethylsilylbutyne, a precursor compound of the object compound (10) obtained from the above, was dissolved in 280 mL of methylene chloride, treated with 59 mg (0.183 mmol) of tetra-*n*-butyl ammoni-umbromide and 347 mL (347 mmol) of 1 N sodium hydroxide aqueous solution, and stirred for about 2 hours. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with 110 mL of methylene chloride. The combined organic layer was washed with 110 mL of brine, and concentrated under reduced pressure to give the object compound (10, R³, R³ = methyl; 40.9 g, quantitative yield). This compound was used in the next reaction without further purification.

[208] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 4.42 (d, J = 47.1 Hz, 2H), 3.42 (s, 6H), 2.64 (s, 1H)

[209] ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 96.1 (d, J = 20.3 Hz), 82.9 (d, J = 180 Hz), 77.5, 75.5, 51.0

[210]

[211] **Preparation Example 3**

[212] **Ethyl 5-fluoro-4,4-dimethoxy-2-pentynoate (11, R³, R³ = methyl, R⁴ = ethyl)**

[213] A solution of 40.9 g (405 mmol) of diisopropylamine in 270 mL of tetrahydrofuran was cooled to 0°C, and 112 g (405 mmol) of 2.5 M *n*-BuLi in *n*-hexane was added thereto over about 1 hour with maintaining the inner temperature below 14°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for about 30 minutes, and the temperature was adjusted to -78°C. A solution of 41.0 g (311 mmol) of the compound obtained from the above Preparation Example 2 (10, R³, R³ = methyl) dissolved in 160 mL of tetrahydrofuran was added to the reaction mixture over about 2 hours with maintaining the inner temperature below -40°C, and then 60.4 g (557 mmol) of ethyl chloroformate was added thereto over about 1 hour with maintaining the inner temperature below -40°C, and further the reaction mixture was stirred at 0°C for about 2 hours. 250 mL of 10% ammonium chloride aqueous solution was added to the reaction mixture to finish the reaction, and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with 100 mL of ethyl acetate, and the combined organic layer was washed with 100

32

mL of brine and concentrated under reduced pressure to give the crude object compound (11, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl; 95.0 g, calculated yield 70%). This compound was used in the next reaction without further purification

[214] $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 4.45 (d, J = 46.5 Hz, 2H), 4.25 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.43 (s, 6H), 1.31 (t, J = 7.3 Hz, 3H)

[215]

[216] **Preparation Example 4**

[217] **Ethyl 3-(benzylamino)-5-fluoro-4,4-dimethoxypentanoate (12, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl)**

[218] 88 g (431 mmol) of the crude compound obtained from the above Preparation Example 3 (11, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl) was dissolved in 430 mL of methyl-*t*-butyl ether (MTBE), and the temperature was adjusted to 0°C. 31.4 g (293 mmol) of benzylamine was added to the reaction mixture, stirred at 20°C for about 1 hour, and diluted with 450 mL of methyl-*t*-butyl ether. Again, the temperature of the reaction mixture was adjusted to 0°C, 33 g (873 mmol) of NaBH_4 was added to the reaction mixture, and then 259 g (4320 mmol) of acetic acid was added thereto over about 30 minutes. The reaction mixture was maintained at 0°C, and 880 mL (2640 mmol) of 3 N sodium hydroxide aqueous solution was slowly added thereto over about 2 hours. The organic layer was separated, and the separated organic layer was washed with 880 mL of 10% ammonium chloride aqueous solution, and then 880 mL of 1 N hydrochloric acid aqueous solution was added thereto. The aqueous layer was separated, washed with 400 mL of methyl-*t*-butyl ether, and basified by using 246 mL of 10 N sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with 700 mL x 2 of methyl-*t*-butyl ether. The combined organic layer was washed with 400 mL of brine, and concentrated under reduced pressure to give the object compound [12, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl; 60.0 g, 44%, and 65% from the compound of formula (10)]. This compound was used in the next reaction without further purification

[219] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.35-7.21 (m, 5H), 4.53 (2dd, J = 46.8, 10.4 Hz, 2H), 4.13 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.80 (2d, J = 12.8 Hz, 2H), 3.53 (dd, J = 8.4, 4.0 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 2.79 (dd, J = 15.6, 3.6 Hz, 1H), 2.40 (ddd, J = 15.6, 8.0, 1.6 Hz, 1H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 3H)

[220]

[221] **Example 1**

[222] **Ethyl 3-amino-5-fluoro-4,4-dimethoxypentanoate (4, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl)**

[223] 18.3 g (58.5 mmol) of the compound obtained from the above Preparation Example 4 (12, R^3 , R^3 = methyl, R^4 = ethyl) was dissolved in 180 mL of ethanol, and debenzylation was carried out by using activated carbon 5% palladium catalyst (5%

33
33

Pd/C) at the hydrogen pressure of 50 psi for about 4 hours. The reaction mixture was filtered through 5.0 g of Cellite pad, and washed with 90 mL of ethanol, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the object compound (4, 12.8 g, 98%). This compound was used in the next step without any purification.

[224] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 4.53 (2dd, J = 46.5, 10.4 Hz, 2H), 4.14 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 3.57 (dd, J = 11.0, 1.9 Hz, 1H), 3.29 (d, J = 11.7 Hz, 6H), 2.73 (dd, J = 16.5, 2.5 Hz, 1H), 2.36 (ddd, J = 16.5, 10.4, 2.5 Hz, 1H), 1.25 (t, J = 7.3 Hz, 3H)

[225]

[226] **Preparation Example 5**

[227]

5-fluoro-3-(((R)-5-isopropyl-3-(1-isoquinolinyl)-4,5-dihydro-isoxazole-5-carbonyl)-amino)-4,4-dimethoxy-pentanoic acid ethyl ester (13, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl, R⁴=ethyl)

[228] 15.5 g (54.5 mmol) of (5R)-5-isopropyl-3-(1-isoquinolinyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole carboxylic acid (2, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl) was dissolved in 150 mL of methylene chloride, the temperature was adjusted to 0°C, and then 7.1 mL (81.7 mmol) of oxalyl chloride and 0.2 mL (2.6 mmol) of DMF were added thereto with maintaining the inner temperature below 12°C. The reaction mixture was stirred at 20°C for about 2 hours, and concentrated under reduced pressure. The reaction mixture was dissolved in 150 mL of methylene chloride, the temperature was adjusted to 0°C, triethylamine was added thereto, and a solution of 12.8 g (57.4 mmol) of the compound obtained from Example 1 (4, R³, R³=methyl, R⁴=ethyl) dissolved in 30 mL of methylene chloride was slowly added thereto over 20 minutes. The reaction mixture was stirred at 25°C for 1.5 hours, a mixed solution of 120 mL of 10% sodium hydrogen carbonate aqueous solution and 60 mL of 1 N sodium hydroxide aqueous solution was added thereto to finish the reaction. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with 150 mL x 3 of methylene chloride. The combined organic layer was concentrated under reduced pressure to give the object compound (13, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl, R⁴=ethyl; 30.1 g, quantitative yield). This compound was used in the next step without any purification.

[229] ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 9.12 (q, 1H), 8.53 (m, 1H), 7.85-7.25 (m, 4H), 4.80 (m, 1H), 4.54-4.34 (m, 2H), 4.14 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 3.99 (2d, J = 18.4 Hz, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.78 (2d, J = 8.6 Hz, 1H), 3.33 (d, 3H), 3.20 (d, 3H), 2.75 (m, 3H), 2.53 (m, 1H), 2.39 (heptet, J = 6.7 Hz, 1H), 1.27 (t, J = 7.4 Hz, 1.5H), 1.07 (m, 6H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 1.5H)

[230]

[231] **Preparation Example 6**

34
34

[232]

5-Fluoro-3-(((R)-5-isopropyl-3-(1-isoquinolinyl)-4,5-dihydro-isoxazole-5-carbonyl)-amino)-4,4-dimethoxy-pentanoic acid (14, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl)

[233]

30.1 g (61.6 mmol) of the compound obtained from the above Preparation Example 5 (13, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl, R⁴=ethyl) together with 7.76 g (185 mmol) of lithium hydroxide monohydrate were dissolved in a mixed solvent of 168 mL of tetrahydrofuran and 42 mL of water, and stirred at about 40°C for 4 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to remove tetrahydrofuran in the solvent, 180 mL of 1 N sodium hydroxide aqueous solution was added thereto, and the mixture was washed with 120 mL x 2 of toluene. The aqueous layer was acidified with 66 mL of 6 N hydrochloric acid aqueous solution, and extracted with 150 mL x 3 of methylene chloride, and the combined organic layer was concentrated under reduced pressure to give the object compound (14, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl; 25.4 g, 89%). This compound was used in the next step without any purification.

[234]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 9.10-8.92 (m, 1H), 8.52 (m, 1H), 7.86-7.13 (m, 4H), 4.77 (m, 1H), 4.54-4.34 (m, 2H), 3.95 (2d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.75 (2d, J = 18.4 Hz, 1H), 3.35-3.16 (2d, 6H), 2.78 (2dd, J = 16.0, 4.4 Hz 1H), 2.54 (m, 1H), 2.39 (m, 1H), 2.35 (s, 1H), 1.06 (m, 6H)

[235]

Example 2

[236]

(4S,5S)-5-fluoromethyl-5-hydroxy-4-(((5R)-5-isopropyl-3-(1-isoquinolinyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl)carbonyl)amino)-2-dihydrofuranone (1, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl)

[237]

17.0 g (36.9 mmol) of the compound obtained from the above Preparation Example 6 (14, R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl, R³, R³=methyl) and 6.6 mL (110 mmol) of acetic acid were dissolved in 123 mL (738 mmol) of 6 N hydrochloric acid aqueous solution, and stirred for about 4 hours. The inner temperature of the reaction mixture was adjusted to 0°C, and 150 mL of ethyl acetate was added thereto. 220 mL (660 mmol) of 3 N sodium hydroxide aqueous solution was slowly added to adjust the pH to about 3. The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with 150 mL x 2 of ethyl acetate. The combined organic phase was washed with 100 mL of brine, and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with 50 mL of toluene, and concentrated again under reduced pressure to give a mixture of the compounds of formula (15) and formula (16) (R¹=1-isoquinolinyl, R²=isopropyl) (15.4 g, quantitative yield, chemical purity: 87.0%).

[238]

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 8.99 (m, 1H), 8.65 (m, 1H), 8.19-7.78 (m, 4H), 5.15 (m, 1.5H), 4.77 (m, 1H), 4.42 (m, 0.5H), 3.91 (2d, J = 17.6 Hz, 1H), 3.74 (m, 1H),

~~38~~
35

2.99 (m, 0.2H), 2.82 (m, 1H), 2.63 (m, 0.8H), 2.33 (m, 1H), 0.97 (m, 6H)

[239] To 146 mL of toluene was added 14.6 g (35.2 mmol) of the mixture of the compounds of formula (15) and formula (16) ($R^1=1$ -isoquinolinyl, R^2 = isopropyl) (chemical purity: 87.0%), and the mixture was heated up to 100°C to dissolve it completely. Then, 14 mg of seed of the object compound (1, $R^1=1$ -isoquinolinyl, R^2 = isopropyl) was added thereto, the temperature was slowly lowered to 20°C, and the reaction mixture was stirred to produce solid. 0.25 mL (1.8 mmol) of diisopropylamine was added thereto, and stirred at 20°C for about 2 weeks, to confirm that the ratio between the compound of formula (15) and the compound of formula (16) ($R^1=1$ -isoquinolinyl, R^2 = isopropyl) is 92.8:7.2 by HPLC. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure to remove toluene, 88 mL of ethyl acetate was added thereto, and the mixture was heated up to 65°C to dissolve it completely. Then, 88 mL of normal hexane was added thereto, and the temperature was slowly lowered and stirred at about 20°C for 2 days. The resulting solid was filtered, and washed with a mixed solution of 15 mL of ethyl acetate and 15 mL of normal hexane. After drying the solid with nitrogen, the object compound, a white solid (1, $R^1=1$ -isoquinolinyl, R^2 = isopropyl), was obtained in 54.7% of yield from the compound of formula (2) (8.0 g, chemical purity 98.6%).

[240] Solid NMR data of the crystalline form was obtained by using VACP MAS (variable amplitude cross polarization magic angle spinning) at 9 kHz spinning rate.

[241] ^1H NMR (CDCl_3): 9.02 (bs, 1H), 8.54 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H), 7.70 (m, 3H), 7.60 (bs, 1H), 4.86 (bs, 1H), 4.2-5.2 (bs, 2H), 4.05 (b, $J = 19.0$ Hz, 1H), 3.78 (b, $J = 19.0$ Hz, 1H), 2.7-3.1 (bm, 2H), 2.40 (m, 1H). 1.08 (dd, $J = 6.7, 4.9$ Hz, 6H)

[242] ^{13}C NMR (CDCl_3): 173.8, 172.4, 160.2, 147.6, 141.7, 136.8, 130.7, 129.0, 127.4, 127.3, 126.8, 122.9, 92.3, 82.7 (d, $J = 215$ Hz), 48.9 (b), 44.6, 34.4, 33.9, 17.7, 16.3

[243] ^{13}C NMR (solid): 176.4, 171.8, 160.3, 150.2, 139.5, 137.5, 132.3 (2C), 127.7 (3C), 123.0, 104.3, 94.1, 86.4, 48.8, 42.9, 32.7 (2C), 19.6, 15.4

[244] Mass (ESI): 416.14 ($M+1$)

$[\alpha]_D^{25} = +3.2$ ($c=1.0$, acetonitrile)

[245] **Experimental Example 1**

[246] **Stability Test**

[247] As shown in Fig. 2, as a result of the stability test on the amorphous form and crystalline form of the compound of formula (1) ($R^1=1$ -isoquinolinyl, R^2 = isopropyl), it was observed that 50% of the amorphous form was destroyed after 28 days under severe condition (60°C), but the quantitative amount of the crystalline form was not

36
36

decreased at all under the same condition (60°C) even after 28 days. Therefore, it should be understood that the crystalline form has better stability than the amorphous form enough to be used for the composition of inhibitor or therapeutic agent.

[248]

[249]

Experimental Example 2

[250]

Treatment effect on LPS-induced acute hepatitis in mice

[251]

Step 1: Preparation of blood sample

[252]

Male Balb/c mice (6 weeks, Charles River Laboratory, Osaka, Japan) were bred up at 22 °C under 55% of relative humidity, with changing night/day per 12 hours. Feed and water were supplied without limit. LPS (lipopolysaccharide) and D-galactosamine were dissolved in the concentrations of 0.4 mg/mL and 280 mg/mL, respectively, in pyrogen-free saline, and mixed in the ratio of 1:1. The solution was injected into the mice in the amount of 5 ml/kg. Immediately after the injection of LPS and D-galactosamine, vehicle wherein the test compound is dissolved (a mixture consisting of PEG400 : ethanol : Tween80 in 15 : 7.5 : 2.5 is 1/5 diluted with saline) or vehicle alone was injected to the test animal. Blood samples were obtained from the mice hearts 8 hours after the drug injection.

[253]

[254]

Step 2: Blood plasma aminotransferase activity assay

[255]

Blood plasma ALT activity of the blood samples obtained in the Step 1 was measured by using ALT assay kit (Asan pharmaceutical company) according to the manufacturer's protocol. It was observed that administration of LPS and D-galactosamine rapidly increased ALT activity in blood plasma, and the test material inhibited such increased enzymatic activity in a dose-dependent manner. Based on these results, ED₅₀ value for each test material was calculated by using Prism software (GraphPad Co.).

[256]

[257]

Experimental Example 3

[258]

Treatment effect on Fas antibody-induced acute hepatitis in mice

[259]

Male Balb/c mice (6 weeks, Charles River Laboratory, Osaka, Japan) were bred up at 22°C under 55% of relative humidity, with changing night/day per 12 hours. Feed and water were supplied without limit. Fas antibody was dissolved in the concentration of 30 ug/mL in pyrogen-free saline, and the solution was injected into the mice in the amount of 5 ml/kg. Immediately after injection of Fas antibody, vehicle wherein the test compound is dissolved (a mixture consisting of PEG400 : ethanol : Tween80 in 15 : 7.5 : 2.5 is 1/5 diluted with saline) or vehicle alone was injected to the test animal. Blood samples were obtained from the mice hearts 8 hours after the drug injection. ED₅₀ value for the obtained blood sample was calculated by using the above test method.

37
37

The following Table 1 shows the pharmacological effect test results in acute hepatitis model according to administration route of the compound of formula (1) obtained from the above Examples 2 and 3.

[260]

[261]

Table 1

Model 1	Administration route	ED ₅₀ (mg/kg)	95% confidence interval (mg/kg)
LPS/D-Gln	Intravenous administration	0.015	0.002~0.111
	Oral administration	0.02	0.003~0.118
Fas antibody	Intravenous administration	0.003	0.001~0.006
	Oral administration	0.018	0.013~0.026

[262]

[263]

[264]

[265]

INDUSTRIAL APPLICABILITY

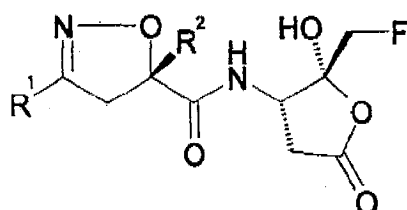
The isoxazoline derivative having cyclic carboxylic acid hemiketal of formula (1) according to the present invention has excellent caspase inhibitory activity and excellent stability. In addition, the process according to the present invention produces only one diastereoisomer of high purity by using crystallization-induced dynamic transformation. Further, if amine derivative having ketal according to the present invention is used as intermediate, a person skilled in the art can easily prepare the isoxazoline derivative having cyclic carboxylic acid hemiketal without additional purification.

28
38

Claims

[1] 1. A compound of formula (1):

[2]



[3]

(1)

wherein

R¹ is alkyl or aryl, and

R² is alkyl.

[4]

2. The compound of claim 1, wherein

R¹ is isoquinolinyl, quinolinyl or naphthyl, and

R² is methyl, ethyl, propyl or butyl.

[5]

3. The compound of claim 2, wherein

R¹ is isoquinolinyl, and R² is isopropyl.

[6]

4. A process for preparing a compound of formula (1), comprising:

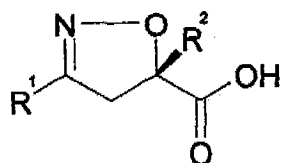
(a) activating a compound of formula (2), then reacting it with a compound of formula (4) to produce a compound of formula (13);

(b) hydrolyzing the compound of formula (13) to produce a compound of formula (14);

(c) deprotecting the compound of formula (14); and

(d) carrying out crystallization-induced dynamic transformation;

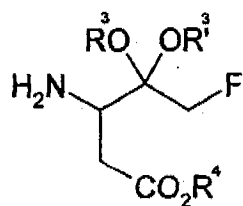
[7]



[8]

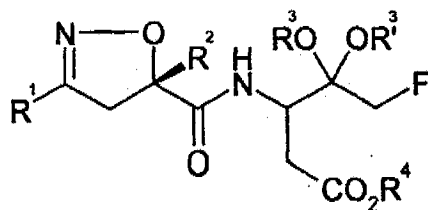
(2)

[9]



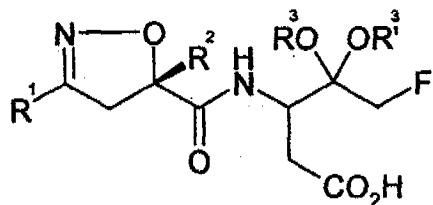
(4)

[10]

39
39

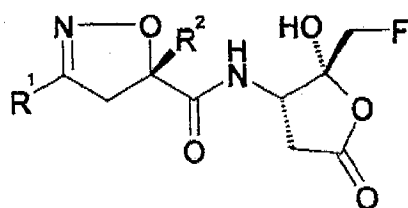
(13)

[11]



(14)

[12]



[13]

(1)

wherein,

R¹ is alkyl or aryl,R² is alkyl,R³ and R³ are each alkyl, orR³ and R³ together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, andR⁴ is alkyl.

[14]

5. The process of claim 4, wherein

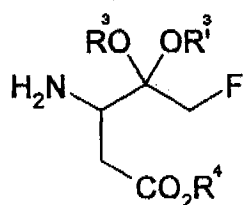
R¹ is isoquinolinyl, quinolinyl or naphthyl,R² is methyl, ethyl, propyl or butyl,R³ and R³ are each methyl, ethyl or propyl, orR³ and R³ together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or dioxane, andR⁴ is methyl, ethyl, propyl or butyl.

[15]

6. The process of claim 4 or 5, wherein the compound of formula (2) in the step (a) is activated by an activation reagent selected from the group consisting of oxalyl chloride, trimethylacetyl chloride, phosphoryl tri-chloride and thionyl chloride.

40

- [16] 7. The process of claim 4 or 5, wherein the reaction in the step (a) is carried out in the presence of base selected from the group consisting of triethylamine, tri(n-butyl)amine, diisopropylethylamine, pyridine, 4-dimethylaminopyridine and 4-(4-methyl-piperidine-1-yl)-pyridine.
- [17] 8. The process of claim 4 or 5, wherein the hydrolysis in the step (b) is carried out in the presence of base selected from the group consisting of lithium hydroxide, sodium hydroxide, potassium hydroxide and calcium hydroxide.
- [18] 9. The process of claim 4 or 5, wherein the deprotection reaction in the step (c) is carried out in the presence of acid selected from the group consisting of hydrochloric acid, sulfuric acid and trifluoroacetic acid.
- [19] 10. The process of claim 4 or 5, wherein the deprotection reaction in the step (c) is carried out in the presence or absence of solvent selected from dichloromethane or chloroform.
- [20] 11. The process of claim 4 or 5, wherein the crystallization-induced dynamic transformation reaction in the step (d) is carried out by adding the compound of formula (1) as seed.
- [21] 12. The process of claim 11, wherein the crystallization-induced dynamic transformation reaction in the step (d) is carried out in the presence of seed and a catalytic amount of base.
- [22] 13. The process of claim 12, wherein the base is an amine selected from the group consisting of triethylamine, tri(n-butyl)amine, diisopropylethylamine, diisopropylamine, pyridine, 4-dimethylaminopyridine, 4-(4-methyl-piperidine-1-yl)-pyridine, optically active 1-phenylethylamine, and optically active 1-naphthylethylamine.
- [23] 14. The process of claim 13, wherein the amine is used in an amount of 0.001 to 1.0 equivalent to the compound of formula (14).
- [24] 15. A compound of formula (4):
- [25]



(4)

wherein

 R^3 and R^3 are each alkyl, or R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and

41

R^4 is alkyl.

[26]

16. The compound of claim 15, wherein

R^3 and R^3 each are methyl, ethyl or propyl, or

R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or dioxane, and

R^4 is methyl, ethyl, propyl or butyl.

[27]

17. A process for preparing a compound of formula (4), comprising:

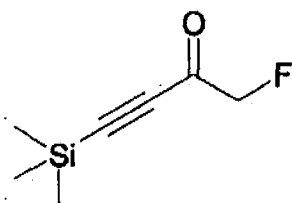
(a) protecting and deprotecting a compound of formula 9 to produce a compound of formula (10);

(b) carrying out carbon-carbon coupling reaction of the compound of formula (10) to produce a compound of formula (11);

(c) reacting the compound of formula (11) with benzyl amine, and reducing it to produce a compound of formula (12); and

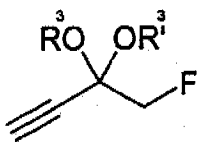
(d) hydrogenating the compound of formula (12);

[28]



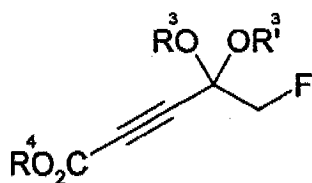
(9)

[29]



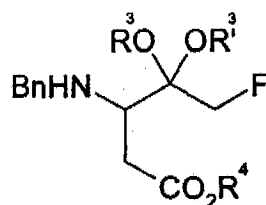
[30]

(10)



(11)

[31]

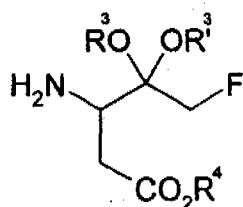


[32]

(12)

42

[33]



(4)

[34]

wherein

 R^3 and R^3 each are alkyl, or R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form heterocycle, and R^4 is alkyl.

[35]

18. The process of claim 17,

wherein R^3 and R^3 each are methyl, ethyl or propyl, or R^3 and R^3 together with oxygen atom to which they are attached form dioxolane or dioxane, and R^4 is methyl, ethyl, propyl or butyl.

[36]

19. The process of claim 17 or 18, wherein the protection reaction in the step (a) is carried out by using trimethylorthoformate or triethylorthoformate.

[37]

20. The process of claim 17 or 18, wherein the deprotection reaction in the step (a) is carried out in the presence of base selected from sodium hydroxide, potassium hydroxide, sodium carbonate and sodium hydrogen carbonate.

[38]

21. The process of claim 17 or 18, wherein the reaction in the step (b) is carried out by using ethylchloroformate or methylchloroformate.

[39]

22. The process of claim 21, wherein the reaction in the step (b) is carried out in the presence of base selected from n-butyllithium, lithiumdiisopropylamine or lithiumhexamethyldisilazide.

[40]

23. The process of claim 17 or 18, wherein the reduction reaction in the step (c) is carried out by using acetic acid and sodium borohydride.

[41]

24. The process of claim 17 or 18, wherein the reaction in the step (d) is carried out in the presence of metal catalyst.

[42]

25. The process of claim 24, wherein the metal catalyst is palladium family catalyst or raney nickel family catalyst.

[43]

26. A pharmaceutical composition for treating inflammation or preventing apoptosis, comprising the compound of formula (1) according to claim 1 and pharmaceutical acceptable carriers.

[44]

27. The pharmaceutical composition of claim 26, wherein the composition is used for dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes,

43

43

gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

- [45] 28. The compound of claim 3, wherein the compound is a crystalline form showing the following X-ray diffraction pattern:

[46]

D (Å)	Relative strength(I/I ₀)	2θ Angle
9.665	0.555	9.15
7.284	0.397	12.15
5.825	0.260	15.21
5.563	0.228	15.93
5.372	0.302	16.5
4.840	1.000	18.33
4.695	0.477	18.9
4.341	0.454	20.46
3.663	0.230	24.3
3.414	0.219	26.1

[47]

[48]

29. A method for treating inflammation or preventing apoptosis in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of the compound of formula (1) according to claim 1 to the subject.

[49]

30. The method of claim 29, wherein the method is used for dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

[50]

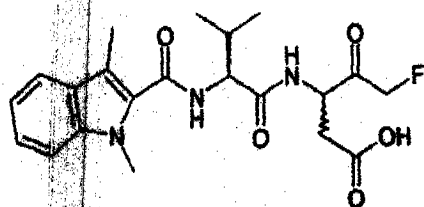
31. A use of the compound of formula (1) according to claim 1 for the manufacture of a medicament for treating inflammation or preventing apoptosis.

[51]

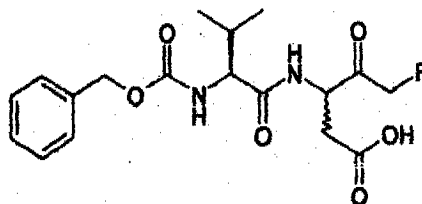
32. The use of claim 31, wherein the medicament is used for dementia, cerebral stroke, brain impairment due to AIDS, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

La presente invención se refiere a un derivado de isoxazolina que tiene una parte hemiacetal de ácido carboxílico cíclico para usar como un inhibidor de caspasa, a un procedimiento para prepararlo, a una composición farmacéutica que lo comprende y al uso del mismo.

El inhibidor de caspasa se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad de la caspasa, regulando de este modo la inflamación o la apoptosis provocada por la función de la caspasa. Entre los inhibidores de la caspasa, se conoce que el inhibidor irreversible muestra una actividad de inhibición más efectiva, ya que inactiva en forma irreversible a una enzima para controlar la apoptosis (Wu, J. y col., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1999, 17, 329). Los siguientes compuestos son conocidos como inhibidores irreversibles y tienen en común una parte de ácido 3-amino-5-fluoro-4-oxopentanoico.



IDN-1965



MX-1013

Entre las enfermedades que pueden ser tratadas o aliviadas por la administración de los compuestos arriba mencionados, se encuentran artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de injerto vs. huésped,

sepsis, osteoartritis, osteoporosis, leucemia mielogénica aguda y crónica, meningitis, salpingitis, shock séptico, colangitis, colitis, encefalitis, endocarditis, glomerulonefritis, hepatitis, miocarditis, pancreatitis, diabetes mellitus Tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hepatocirrosis, etc.

Referencias:

Demencia: Arch. Neurol. 2003, Mar; 60(3): 369-76, "Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease". Pompl. PN, Yemul, S., Xiang, Z., Ho, L., Haroutunian, V. Purohit, D., Mohs, R., Pasinetti, G.M.;

Accidente cerebrovascular: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, Nov. 12; 99(23): 15188-93, "Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation". Le, D.A., Wu, Y., Huang, Z., Matshushita, K., Plesnila, N., Augustinack, J.C., Hyman, B.T., Yuan, J., Kuida, K., Flavell, R.A., Moskowitz, M.A.;

Dañó cerebral debido a SIDA: J. Neurosci. 2002, Mayo 15; 22(10): 4015-24, "Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration". Garden, G.A., Budd, S.L., Tsai, E., Hanson L., Kaul, M., D'Emilia, D.M., Friedlander, R.M., Yuan, J. Masliah, E., Lipton, S.A.;

Diabetes: Diabetes 2002, Junio; 51(6): 1938-48,

48
48

"Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway". Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., Kang, Y.J. ;

Úlcera gástrica: J. Physiol. Pharmacol. 1998, Dic., 49(4): 489-500, "Role of basic fibroblast growth factor in the suppression of apoptotic caspase-3 during chronic gastric ulcer healing". Slomiany, B.L., Piotrowski, J., Slomiany, A.;

Lesión cerebral por hepatitis: J. Viral Hepat. 2003, Mar.; 10(2): 81-6, "Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection". Forton, D.M., Taylor-Robinson, S.D., Thomas, H.C.;

Insuficiencia hepática fulminante: Gastroenterology 2000, Agosto; 119(2): 446-60, "Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure", Streetz, K. Leifeld, L., Grundmann, D., Ramakers, J., Eckert, K., Spengler, U., Brenner, D., Manns, M., Trautwein, C.;

Sepsis: Nat. Immunol. 2000, Dic.; 1(6) ; 496-501, "Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Hotchkiss, R.S., Chang, K.C., Swanson, P.E., Tinsley, K.W., Hui, J.J., Klender, P., Xanthoudakis, S., Roy, S., Black, C., Grimm, E., Aspiotis, R., Han, Y., Nicholson, D.W., Karl, I.E.;

Rechazo al transplante de órganos: Xenotransplantation 2001, Mayo; 8(2): 115-24, "In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transduced porcine kidney cells". Fujino, M., Li, X.K., Suda, T., Hashimoto, M., Okabe, K., Yaginuma, H., Mikoshiba, K., Guo, L., Okuyama, T., Enosawa, S., Amemiya, H., Amano, T., Suzuki, S.;

Artritis reumatoide: Prog. Med. Chem. 2002; 39: 1-72, "Caspase inhibitors as anti-inflammatory and antiapoptotic agents". Graczyk, P.P.;

Enfermedades cardíacas isquémicas: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2002, Sept.; 283(3): H990-5, "Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes". Todor, A., Sharov, V.G., Tanhehco, E.J., Silverman, N., Bernabei, A., Sabbah, H.N.;

Anti-inflamación: J. Immunol. 2003; Mar. 15; 170(6): 3386-91, "A broad-spectrum caspase inhibitor attenuates allergic airway inflammation in murine asthma model". Iwata, A., Nishio, K., Winn, R.K., Chi, E.Y., Henderson, W.R. Jr., Harlan, J.M.;

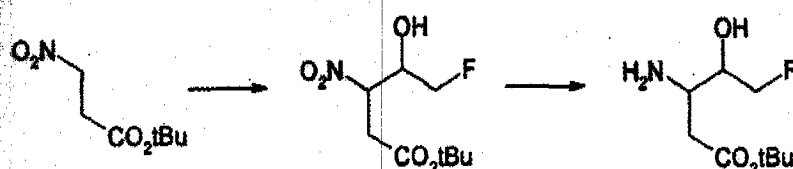
Hepatocirrosis: i) J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004, Mar.; 308(3): 1191-6, "The caspase inhibitor Idn-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse". Canbay, A., Fledstein, A., Baskin-Bey, E., Bronk, F.S., Gores, G.J.; ii) Hepatology. 2004, Feb.; 39(2): 273-8,

88
50

"Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis", Canbay, A., Friedman, S., Gores, G.J.; iii) Hepatology, 2003, Nov.; 38(5): 1188-98, "Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., Gores, G.J.

Por otro lado, para la parte de ácido 3-amino-5-fluoro-4-oxopentanoico del inhibidor de caspasa, se conoce en el arte un procedimiento de preparación tal como el siguiente Esquema de reacción 1 (Revesz y col., Tetrahedron Lett. 1994, 35, 9693).

Esquema de reacción 1



Los presentes inventores han continuado estudiando un compuesto que puede ser usado como un inhibidor efectivo de la caspasa, y un procedimiento para su preparación.

Como resultado, descubrieron que el derivado de isoxazolina que tiene una parte hemiacetal de ácido carboxílico cíclico de acuerdo con la presente invención tiene una buena actividad de inhibición de caspasa, y puede ser preparado con alta pureza usando la transformación dinámica inducida por cristalización, para completar la

ST
51

presente invención.

Así, un objeto de la presente invención es proveer un compuesto de la siguiente fórmula (1) con la estructura de isoxazolina y partes hemiacetal de ácido carboxílico cíclico, y un nuevo procedimiento para la preparación efectiva del mismo.

Otro objeto de la presente invención es proveer un derivado amina de la siguiente fórmula (4), un intermediario para el compuesto de la siguiente fórmula (1) y un procedimiento para prepararlo.

Otro objeto de la presente invención es proveer una composición farmacéutica para tratar la inflamación o evitar la apoptosis, que comprende el compuesto de la siguiente fórmula (1) y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención es proveer un método para tratar la inflamación o evitar la apoptosis en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la siguiente fórmula (1) al paciente.

Otro objeto de la presente invención es proveer un uso del compuesto de la siguiente fórmula (1) para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación o evitar la apoptosis.

Otro objeto de la presente invención es proveer una forma cristalina del compuesto de la siguiente fórmula (1)

que tiene buena estabilidad.

La Fig. 1 es un espectro de difracción de rayos X de la forma cristalina del compuesto de fórmula (1) (R^1 = isoquinolinilo, R^2 = isopropilo) de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de la prueba de estabilidad de la forma cristalina y la forma amorfa del compuesto de fórmula (1) (R^1 = isoquinolinilo, R^2 = isopropilo) de acuerdo con la presente invención.

Algunos términos importantes usados en la presente invención pueden ser definidos como sigue:

En las fórmulas y los esquemas de reacción usados en la presente invención alquilo se refiere al grupo alquilo lineal o ramificado que consiste en 1 a 8 átomos de carbono o un grupo cicloalquilo que consiste en 3 a 10 átomos de carbono.

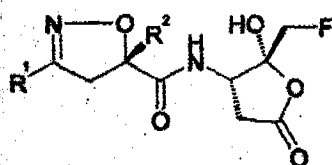
Además, arilo incluye todo el grupo aromático, el grupo heteroaromático y derivados parcialmente reducidos del mismo. Dicho grupo aromático se refiere a hidrocarburos insaturados de 5 a 15 miembros en una forma cíclica simple o fusionada y dicho grupo heteroaromático se refiere a grupos aromáticos que tienen 1 a 5 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno.

Además, uno o más hidrógenos de dicho alquilo y dicho arilo pueden ser substituidos por otros substituyentes. Los

53

ejemplos de substituyentes seleccionables incluyen acilo, amino, carboalcoxi, carboxi, carboxiamino, ciano, halo, hidroxil, nitro, tiol, alquilo, cicloalquilo, alcoxi, ariloxi, sulfoxi, guanido, etc.

La presente invención se refiere a un derivado de isoxazolina que tiene una parte hemiacetal de ácido carboxílico cíclico de la siguiente fórmula (1) para usar



(1)

como inhibidor de la caspasa:

en donde:

R¹ es alquilo o arilo, y

R² es alquilo.

Preferentemente:

R¹ es isoquinolinilo, quinolinilo o naftilo, y

R² es metilo, etilo, propilo o butilo.

Más preferentemente, R¹ es isoquinolinilo y R² es isopropilo.

El compuesto de fórmula (I) en donde R¹ es isoquinolinilo y R² es isopropilo puede existir como una forma cristalina que presenta el siguiente modelo de difracción de rayos X:

34

D (X)	Concentración relativa (I/I ₀)	Ángulo 2θ
9,665	0,555	9,15
7,284	0,397	12,15
5,825	0,260	15,21
5,563	0,228	15,93
5,372	0,302	16,5
4,840	1,000	18,33
4,695	0,477	18,9
4,341	0,454	20,46
3,663	0,230	24,3
3,414	0,219	26,1

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto de fórmula (1), que comprende:

(a) activar un compuesto de la siguiente fórmula (2), luego hacerlo reaccionar con un compuesto de la siguiente fórmula (4) para producir un compuesto de la siguiente fórmula (13);

(b) hidrolizar el compuesto de la siguiente fórmula (13) para producir un compuesto de la siguiente fórmula (14);

(c) desproteger el compuesto de la siguiente fórmula (14), y

(d) llevar a cabo la transformación dinámica inducida por cristalización.

5-5
56

en donde:

R¹ es alquilo o arilo,

R² es alquilo,

R³ y R'³ son cada uno alquilo, o

R³ y R'³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

R⁴ es alquilo.

Preferentemente:

R¹ es isoquinolinilo, quinolinilo o naftilo,

R² es metilo, etilo, propilo o butilo,

R³ y R'³ son cada uno metilo, etilo o propilo, o

R³ y R'³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un dioxolano o dioxano, y

R⁴ es metilo, etilo, propilo o butilo.

Cada paso del procedimiento de preparación arriba mencionado del compuesto de fórmula (1) puede ser descripto con mayores detalles como sigue:

Como un reactivo de activación para activar al compuesto de fórmula (2) en el paso (a) arriba mencionado es preferible usar uno seleccionado entre el grupo que consiste en cloruro de oxalilo, cloruro de trimetilacetilo, tri-cloruro de fosforilo y cloruro de tionilo.

Además, es preferible que la reacción en el paso (a) sea llevada a cabo en la presencia de una base seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, tri(n-

87
5+

butil)amina, diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina y 4-(4-metil-piperidina-1-il)-piridina, y es preferible que la base se use en una cantidad de 1,0 a 10,0 equivalentes al compuesto de fórmula (2).

Además, es preferible que la reacción en el paso (a) sea llevada a cabo en uno o más solventes seleccionados entre el grupo que consiste en diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, dimetoxietano, dioxano y acetato de etilo.

Por otro lado, es preferible que el compuesto de fórmula (4) en el paso (a) se use en una cantidad de 1,0 a 3,0 equivalentes al compuesto de fórmula (2).

Es preferible que la hidrólisis en el paso (b) sea llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de litio (preferentemente anhidro o monohidrato cristalino), hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio, y también es preferible que la base sea usada en una cantidad de 0,1 a 10,0 equivalentes al compuesto de fórmula (13).

Además, es preferible que la reacción en el paso (b) sea llevada a cabo en uno o más solventes seleccionados entre el grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, dimetoxietano, dioxano y diclorometano, o en un solvente mixto del solvente seleccionado entre el grupo arriba mencionado y agua.

Es preferible que la reacción de desprotección en el

48
JB

paso (c) sea llevada a cabo en presencia de un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido trifluoroacético, y es preferible que el ácido sea usado en una cantidad de 0,1 a 20,0 equivalentes al compuesto de fórmula (14).

Además, es preferible que la reacción de desprotección en el paso (c) sea llevada a cabo en presencia o ausencia de un solvente seleccionado entre diclorometano o cloroformo.

La reacción de transformación dinámica inducida por cristalización en el paso (d) puede ser llevada a cabo agregando el compuesto de fórmula (1) como un germen, o llevada a cabo en presencia de un germen y una cantidad catalítica de una base, en donde la base es preferentemente una amina seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, tri(n-butil)amina, diisopropiletilamina, diisopropilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, 4-(4-metil-piperidina-1-il)-piridina, 1-feniletilamina ópticamente activa y 1-naftiletilamina ópticamente activa.

En el paso (d) es preferible usar dicha amina en una cantidad de 0,001 a 1,0 equivalentes al compuesto de fórmula (14) y más preferible usar 0,03 a 0,5 equivalentes. Si la cantidad de amina usada es demasiado pequeña, la velocidad de reacción es más lenta, y si la cantidad es demasiado grande, el rendimiento del compuesto de fórmula (1) disminuye.

Además, es preferible que la reacción de transformación dinámica inducida por cristalización en el paso (d) sea llevada a cabo en uno o más solventes seleccionados entre el grupo que consiste en tolueno, benceno, diclorobenceno, tetrahidrofurano, dimetoxietano, dioxano, acetato de etilo, diclorometano, acetonitrilo, metil t-butiléter y dietiléter.

A continuación se explicará con mayores detalles el procedimiento para preparar el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la presente invención, con referencia al Esquema de reacción 2.

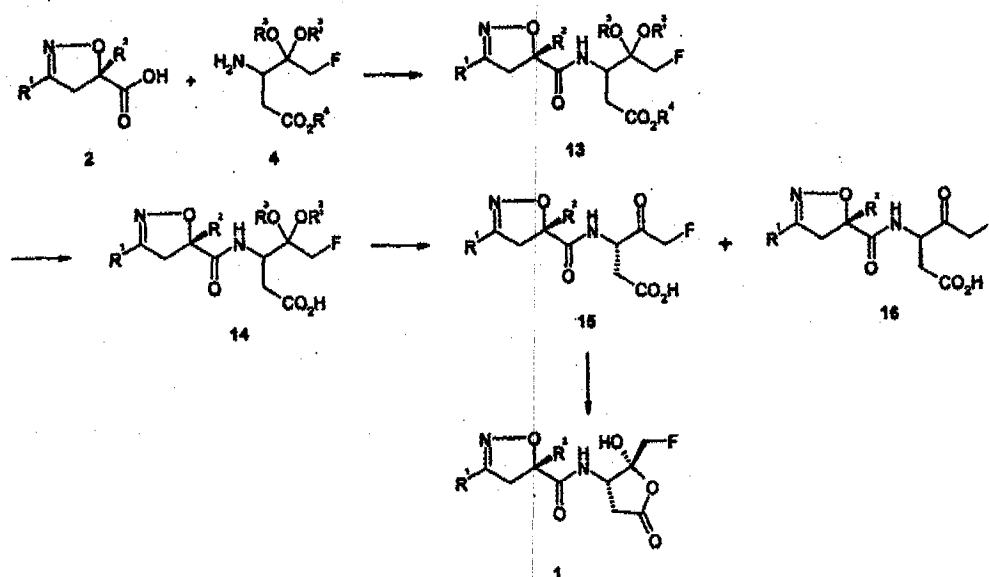
El derivado de isoxazolina de fórmula (2) que tiene alta actividad óptica es preparado de acuerdo con el procedimiento divulgado en la PCT/KR2004/002060 presentada el 17 de agosto de 2004 por el presente solicitante, y luego combinado con el compuesto de fórmula (4) para producir el compuesto de fórmula (13). Luego, el compuesto de fórmula (13) es éster-hidrolizado para producir el compuesto de fórmula (14) y la reacción de desprotección de la parte cetel del compuesto de fórmula (14) es llevada a cabo para obtener una mezcla de los compuestos de fórmula (15) y fórmula (16), que es transformada efectivamente en el compuesto de fórmula (1) por cristalización dinámica selectiva.

En particular, si la mezcla de los compuestos de fórmula (15) y fórmula (16) se disuelve en un solvente

60
60

orgánico, y el germen del compuesto de fórmula (1) se agrega a la solución, sólo el compuesto de fórmula (15) en la mezcla es transformado en el compuesto de fórmula (1) a ser aislado como un sólido.

Esquema de reacción 2



en donde:

R¹ es alquilo o arilo,

R² es alquilo,

R³ y R³ son cada uno alquilo, o

R³ y R³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

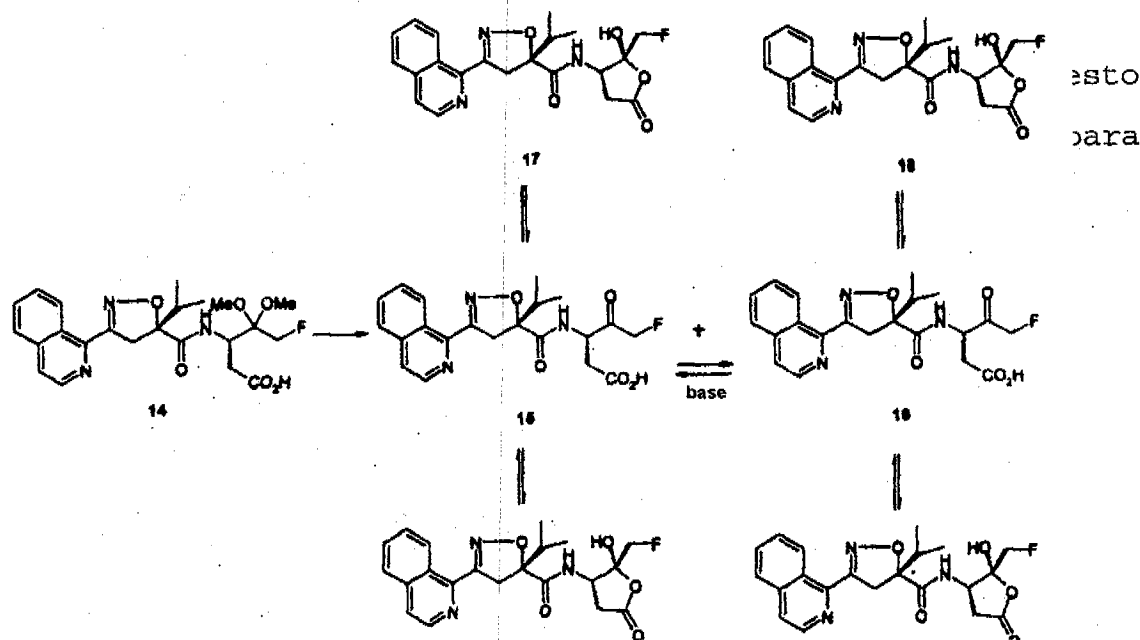
R⁴ es alquilo.

Además, si la mezcla de los compuestos de fórmula (15) y fórmula (16) es tratada con una cantidad catalítica de una

61

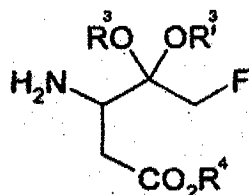
base junto con un germen, ambos, el compuesto de fórmula (15) y el compuesto de fórmula (16) son transformados en el compuesto de fórmula (1), para producir el compuesto de fórmula (1) con un rendimiento más alto (Esquema de reacción 3). El compuesto de fórmula (15) se encuentra en equilibrio con el compuesto de fórmula (16) debido a la base presente en solución. Además, el compuesto de fórmula (15) se encuentra en equilibrio con los compuestos de fórmula (17) y fórmula (1), y el compuesto de fórmula (16) se encuentra en equilibrio con los compuestos de fórmula (18) y fórmula (19). Entre estos, el compuesto de fórmula (1) que tiene buenas propiedades de cristalización precipita selectivamente, y así el equilibrio de todos los compuestos se mueve al compuesto de fórmula (1), dando de este modo selectivamente sólo el compuesto de fórmula (1) con alto rendimiento de la mezcla de los compuestos de fórmula (15) y fórmula (16).

Esquema de reacción 3



82
62

en donde:



(4)

R³ y R³ son cada uno alquilo, o

R³ y R³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

R⁴ es alquilo.

Preferentemente:

R³ y R³ son cada uno metilo, etilo o propilo, o

R³ y R³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un dioxolano o dioxano, y

R⁴ es metilo, etilo, propilo o butilo.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto de fórmula (4), que comprende:

(a) proteger y desproteger a un compuesto de la siguiente fórmula (9) para producir un compuesto de la siguiente fórmula (10);

(b) llevar a cabo una reacción de acoplamiento carbono-carbono del compuesto de fórmula (10) para producir un compuesto de la siguiente fórmula (11);

(c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (11) con

forman un dioxolano o dioxano, y R^4 es metilo, etilo, propilo o butilo.

El procedimiento arriba mencionado para preparar el compuesto de fórmula (4) se describirá más específicamente a continuación.

En el paso (a), es preferible que el compuesto de fórmula (9) sea protegido usando trimetilortoformato o trietilortoformato, y la reacción de desprotección es llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, e hidrógeno carbonato de sodio. Además, es preferible que la base en la reacción de desprotección arriba mencionada sea usada en una cantidad de 1,0 a 2,0 equivalentes al compuesto de fórmula (9).

Además, es preferible que la reacción de protección en el paso (a) sea llevado a cabo en solvente metanol o etanol, y la reacción de desprotección sea llevada a cabo en uno o más solventes seleccionados entre el grupo que consiste en metanol, etanol, diclorometano, cloroformo y agua.

Además, es preferible que la reacción en el paso (b) sea llevada a cabo usando etilcloroformato o metilcloroformato en presencia de una base seleccionada entre *n*-butyllitio, diisopropilamina de litio o hexametildisilazida de litio, y la base sea usada en 0,5 a 3,0 equivalentes al compuesto de fórmula (10), y dicho

66
66

etilcloroformato o metilcloroformato sea usada en 0,5 a 3,0 equivalentes al compuesto de fórmula (10).

Además, es preferible que la reacción en el paso (b) sea llevada a cabo en un solvente seleccionado entre el grupo que consiste en tetrahidrofurano, etil éter y metil-t-butil éter.

Es preferible que la reacción de reducción en el paso (c) sea llevada a cabo usando ácido acético y borohidruro de sodio y que dicho borohidruro de sodio se use en 1,0 a 5,0 equivalentes al compuesto de fórmula (11), y dicho ácido acético se use en 1,0 a 20,0 equivalentes al compuesto de fórmula (11).

Además, es preferible que dicha bencilamina en el paso (c) se use en 1,0 a 10,0 equivalentes al compuesto de fórmula (11).

Además, es preferible que la reacción en el paso (c) sea llevada a cabo en presencia o ausencia de un solvente seleccionado entre acetato de etilo, tetrahidrofurano, etil éter y metil-t-butiléter, y pueda ser llevada a cabo como una reacción de un solo recipiente, si se desea.

Es preferible que la reacción en el paso (d) sea llevada a cabo en presencia de un catalizador de metal, más preferentemente un catalizador de la familia del paladio o un catalizador de la familia del níquel de Raney. Específicamente, el catalizador de la familia del paladio

67

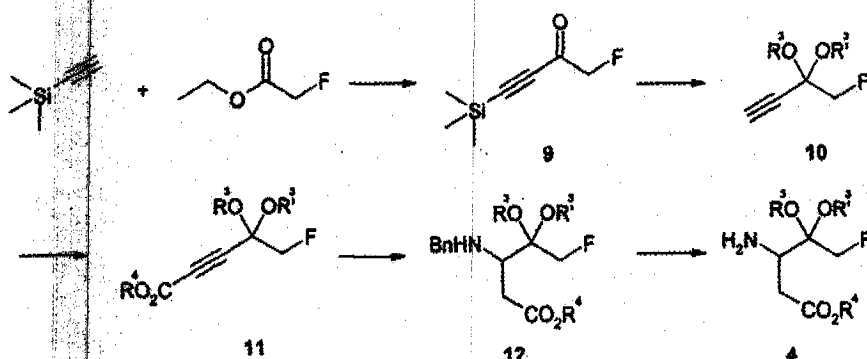
que tiene 1 a 20% en peso de un catalizador de la familia del paladio (Pd) o de un catalizador de la familia del níquel de Raney que tiene 1% en peso o más de níquel de Raney, soportado en un vehículo seleccionado entre el grupo que consiste en carbono, sílice y alúmina, puede ser usado en una cantidad de 0,01 a 10% en peso basado en su componente metálico con respecto al compuesto de fórmula (12).

Además, es preferible que la reacción en el paso (d) sea llevada a cabo en uno o más solventes seleccionados entre el grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, dimetoxietano, dioxano, acetato de etilo y diclorometano.

Además, es preferible que la reacción de hidrogenación en el paso (d) sea llevada a cabo a una temperatura de 0 a 50°C y bajo una presión de hidrógeno de 1 a 100 atm.

Los presentes inventores han desarrollado un nuevo procedimiento para preparar el compuesto de fórmula (4), un intermediario para el compuesto de fórmula (1), con mayor rendimiento, como se ilustra en el siguiente Esquema de reacción 4.

Esquema de reacción 4



68
68

en donde:

R^3 y R'^3 son cada uno alquilo, o

R^3 y R'^3 junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

R^4 es alquilo.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar la inflamación o evitar la apoptosis, que comprende el compuesto de la fórmula (1) arriba definida y vehículos farmacéuticamente aceptables, específicamente una composición farmacéutica para tratar demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo del transplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.

Además, la presente invención se refiere a un método para tratar la inflamación o evitar la apoptosis en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la fórmula (1) arriba definida al paciente, específicamente un método para tratar demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el

69

virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo del transplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.

Además, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la fórmula (1) arriba definida para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación o evitar la apoptosis, específicamente un medicamento para tratar demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo del transplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.

El compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la presente invención puede ser formulado en varias formas farmacéuticas para el propósito de su administración. Para preparar la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se mezcla una cantidad efectiva del compuesto de fórmula (1) con un vehículo farmacéuticamente aceptable que puede adoptar una variedad de formas dependiendo de la formulación a ser preparada.

El compuesto de fórmula (1) puede ser formulado como una inyección parenteral, o una preparación percutánea u oral dependiendo de su propósito de aplicación. Es especialmente ventajoso formular la composición en una forma de dosificación unitaria para mayor facilidad de la administración y uniformidad de la dosificación.

Para la preparación oral, se puede usar cualquier vehículo farmacéutico usual. Por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares pueden ser usados para los preparados líquidos orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o almidones, azúcares, caolín, lubricantes, ligantes, agentes desintegrantes y similares pueden ser usados para preparados sólidos tales como polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a la facilidad de su administración, los comprimidos y cápsulas son las formas de unidad de dosificación más ventajosas. También es conveniente que los comprimidos y píldoras sean formulados en un preparado con recubrimiento entérico.

Para el preparado parenteral, se usa generalmente agua estéril como el vehículo, aunque también se pueden usar otros ingredientes como auxiliares de solubilidad. Las inyecciones, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleosas esterilizadas para inyección, pueden ser preparadas de acuerdo con el procedimiento conocido usando un agente dispersante adecuado, un agente humectante, o un agente de

JH
71

suspensión. Los solventes que se pueden usar para preparar inyecciones incluyen agua, fluido de Ringer y solución isotónica de NaCl, y el aceite fijador esterilizado también puede ser usado convenientemente como el solvente o medio de suspensión. Cualquier aceite fijador no estimulante incluyendo mono- y di-glicéridos, puede ser usado para este propósito. También se puede usar un ácido graso tal como el ácido oleico para las inyecciones.

Para el preparado percutáneo, el vehículo puede incluir un agente que aumenta la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinado opcionalmente con aditivos adecuados que no tienen una irritación de la piel significativa. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a través de la piel y/o pueden ayudar a la preparación de una composición deseada. Estos preparados percutáneos son administrados de diversas maneras, por ej., como un parche transdérmico, una aplicación en el sitio, o un ungüento.

Cuando el compuesto de fórmula (1) se usa para propósitos clínicos, es administrado preferentemente al paciente en una cantidad que oscila entre 0,1 y 100 mg por kg de peso corporal por día. La dosis diaria total puede ser administrada de una sola vez o en varias veces. Sin embargo, la dosis de administración específica para un paciente individual puede variar con el compuesto específico usado,

72
72

el peso corporal, el sexo, la condición higiénica, o la dieta del paciente, el tiempo o el método de administración, la velocidad de excreción, la relación de mezclado del agente, la gravedad de la enfermedad a ser tratada, etc.

A continuación, se describirá la presente invención con mayores detalles con referencia a los siguientes Ejemplos, pero el alcance de la presente invención no debería interpretarse como siendo limitado de este modo de ninguna manera.

Ejemplo de preparación 1

1-Fluoro-4-trimetilsilanil-3-butin-2-ona (9)

Se disolvieron 49,1 g (499 mmoles) de trimetilsilil acetileno en 250 ml de tetrahidrofurano anhidro, y la temperatura interior se bajó a aprox. -55°C y luego se agregaron 210 ml (525 mmoles) de 2,5 M n-BuLi en n-hexano durante aprox. 25 minutos manteniendo la temperatura interior por debajo de -30°C . Después de agitar durante aprox. 40 minutos, se agregaron 52,9 g (499 mmoles) de etil fluoracetato a la mezcla de reacción durante 5 minutos manteniendo la temperatura interior por debajo de -25°C , y luego se agregaron 74,4 g (524 mmoles) de $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}$ a la misma durante 15 minutos manteniendo la temperatura interior a -55°C hasta -65°C . Después de finalizar la adición, la mezcla de reacción se agitó a 20°C durante 2 horas y se agregaron a la misma 250 ml de solución acuosa de cloruro de

23
73

amonio al 10% para finalizar la reacción. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 200 ml de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con 250 ml de salmuera y se concentró bajo presión reducida. El residuo se destiló bajo vacío a 10 mbar y 68°C para dar el compuesto de fórmula (9) (67,3 g, 85%) como un aceite claro.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 4,90 (d, $J = 47,1$ Hz, 2H), 0,26 (s, 9H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 181,0 (d, $J = 21,5$ Hz), 104,0, 98,1, 84,8 (d, $J = 187$ Hz).

Ejemplo de preparación 2

4-Fluoro-3,3-dimetoxi-1-butino (10, $\text{R}^3, \text{R}'^3 = \text{metilo}$)

Se colocaron 33,6 g (316 mmoles) de ortoformato de trimetilo y 6,0 g (31,5 mmoles) de $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ junto con 50,0g (316 mmoles) del compuesto de fórmula (9) obtenido a partir del Ejemplo de preparación 1 en 260 ml de metanol y se agitaron a temperatura de reflujo (temperatura interior 60~64°C) durante aprox. 6 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para retirar aprox. 130 ml de solvente y se diluyó con 260 ml de cloruro de metileno. Se agregaron a la misma 130 ml de solución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% y se separó en capas, y la capa acuosa se extrajo usando 130 ml de cloruro de metileno. La capa orgánica combinada se concentró bajo presión reducida para dar 4-fluoro-3,3-dimetoxi-1-

74

trimetilsililbutino (59,0 g, 92%) como un intermediario, un compuesto precursor del compuesto objetivo (10). Este compuesto se usó en la reacción siguiente sin purificación ulterior.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 4,38 (d, $J = 47,1$ Hz, 2H), 3,40 (s, 6H), 0,20 (s, 9H).

Se disolvieron 59,0 g (289 mmoles) de 4-fluoro-3,3-dimetoxi-1-trimetilsililbutino, un compuesto precursor del compuesto objetivo (10) obtenido más arriba, en 280 ml de cloruro de metileno, se trataron con 59 mg (0,183 mmoles) de bromuro de tetra-*n*-butil amonio y 347 ml (347 mmoles) de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, y se agitó durante aprox. 2 horas. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 110 ml de cloruro de metileno. La capa orgánica combinada se lavó con 110 ml de salmuera y se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo (10, R^3 , R'^3 = metilo; 40,9 g, rendimiento cuantitativo). Este compuesto se usó en la reacción siguiente sin purificación ulterior.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 4,42 (d, $J = 47,1$ Hz, 2H), 3,42 (s, 6H), 2,64 (s, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 96,1 (d, $J = 20,3$ Hz), 82,9 (d, $J = 180$ Hz), 77,5, 75,5, 51,0.

Ejemplo de preparación 3

Etil 5-fluoro-4,4-dimetoxi-2-pentinoato (11, R^3 , R'^3 =

75
75

metilo, R⁴ = etilo)

Una solución de 40,9 g (405 mmoles) de diisopropilamina en 270 ml de tetrahidrofurano se enfrió a 0°C y se agregaron a la misma 112 g (405 mmoles) de 2,5 M *n*-BuLi en *n*-hexano durante aprox. 1 hora manteniendo la temperatura interior por debajo de 14°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante aprox. 30 minutos y se ajustó la temperatura a -78°C. Una solución de 41,0 g (311 mmoles) del compuesto obtenido del Ejemplo de preparación 2 arriba mencionado (10, R³, R'³ = metilo) disuelto en 160 ml de tetrahidrofurano se agregó a la mezcla de reacción durante aprox. 2 horas manteniendo la temperatura interior por debajo de -40°C y luego se agregaron a la misma 60,4 g (557 mmoles) de cloroformato de etilo durante aprox. 1 hora manteniendo la temperatura interior por debajo de -40°C, y luego la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante aprox. 2 horas. Se agregaron 250 ml de una solución acuosa de cloruro de amonio al 10% a la mezcla de reacción para finalizar la reacción y la capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con 100 ml de acetato de etilo y la capa orgánica combinada se lavó con 100 ml de salmuera y se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo crudo (11, R³, R'³ = metilo, R⁴ = etilo; 95,0 g rendimiento calculado 70%). Este compuesto se usó en la reacción siguiente sin purificación ulterior.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 4,45 (d, J = 46,5 Hz, 2H), 4,25 (q,

76

J = 7,1 Hz, 2H), 3,43 (s, 6H), 1,31 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo de preparación 4

Etil 3-(bencilamino)-5-fluoro-4,4-dimetoxipentanoato
(12, R³, R³ = metilo, R⁴ = etilo)

Se disolvieron 88 g (431 mmoles) de compuesto crudo obtenido del Ejemplo de preparación 3 arriba mencionado (11, R³, R³ = metilo, R⁴ = etilo) en 430 ml de metil-t-butil éter (MTBE) y se ajustó la temperatura a 0°C. Se agregaron 31,4 g (293 mmoles) de bencilamina a la mezcla de reacción, se agitó a 20°C durante aprox. 1 hora, y se diluyó con 450 ml de metil-t-butil éter. Nuevamente, la temperatura de la mezcla de reacción se ajustó a 0°C, se agregaron 33 g (873 mmoles) de NaBH₄ a la mezcla de reacción y luego se agregaron 259 g (4320 mmoles) de ácido acético a la misma durante aprox. 30 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a 0°C y se agregaron lentamente 880 ml (2640 mmoles) de solución acuosa de hidróxido de sodio 3N a la misma durante aprox. 2 horas. La capa orgánica se separó y la capa orgánica separada se lavó con 880 ml de solución acuosa de cloruro de amonio al 10%, y luego se agregaron a la misma 880 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 1N. La capa acuosa se separó, se lavó con 400 ml de metil-t-butil éter, y se basificó usando 246 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 10N y se extrajo con 700 ml x 2 de metil-t-butil éter. La capa orgánica combinada se lavó con 400 ml de

77

salmuera y se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo [12, R^3 , R'^3 = metilo, R^4 = etilo; 60,0 g, 44% y 65% del compuesto de fórmula (10)]. Este compuesto se usó en la reacción siguiente sin purificación ulterior.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7,35-7,21 (m, 5H), 4,53 (2dd, J = 46,8, 10,4 Hz, 2H), 4,13 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,80 (2d, J = 12,8 Hz, 2H), 3,53 (dd, J = 8,4, 4,0 Hz, 1H), 3,30 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 2,79 (dd, J = 15,6, 3,6 Hz, 1H), 2,40 (ddd, J = 15,6, 8,0, 1,6 Hz, 1H), 1,25 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

Ejemplo 1

Etil 3-amino-5-fluoro-4,4-dimetoxipentanoato (4, R^3 , R'^3 = metilo, R^4 etilo)

Se disolvieron 18,3 g (58,5 mmoles) del compuesto obtenido del Ejemplo de preparación 4 arriba mencionado (12, R^3 , R'^3 = metilo, R^4 = etilo) en 180 ml de etanol y se llevó a cabo la desbencilación usando un catalizador de paladio al 5% sobre carbón activado (5% Pd/C) a la presión de hidrógeno de 50 psi durante aprox. 4 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de 5,0 g de una almohadilla de Cellite y se lavó con 90 ml de etanol y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo (4, 12,8 g, 98%). Este compuesto se usó en el paso siguiente sin purificación.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 4,53 (2dd, J = 46,5, 10,4 Hz, 2H), 4,14 (q, J = 7,3 Hz, 2H), 3,57 (dd, J = 11,0, 1,9 Hz,

78

1H), 3,29 (d, J = 11,7 Hz, 6H), 2,73 (dd, J = 16,5, 2,5 Hz, 1H), 2,36 (ddd, J = 16,5, 10,4, 2,5 Hz, 1H), 1,25 (t, J = 7,3 Hz, 3H).

Ejemplo de preparación 5

Etil éster del ácido 5-Fluoro-3-[(R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-dihidro-isoxazol-5-carbonil)-amino]-4,4-dimetoxi-pentanoico (13, R¹ = 1-isoquinolinilo, R² = isopropilo, R³, R³ = metilo, R⁴ = etilo)

Se disolvieron 15,5 g (54,5 mmoles) de ácido (5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-dihidro-5-isoxazol carboxílico (2, R¹ = 1-isoquinolinilo, R² = isopropilo) en 150 ml de cloruro de metileno, se ajustó la temperatura a 0°C y luego se agregaron 7,1 ml (81,7 mmoles) de cloruro de oxalilo y 0,2 ml (2,6 mmoles) de DMF manteniendo la temperatura interior por debajo de 12°C. La mezcla de reacción se agitó a 20°C durante aprox. 2 horas y se concentró bajo presión reducida. La mezcla de reacción se disolvió en 150 ml de cloruro de metileno, la temperatura se ajustó a 0°C, se agregó trietilamina y luego se agregó lentamente una solución de 12,8 g (57,4 mmoles) del compuesto obtenido del Ejemplo 1 (4, R³, R³ = metilo, R⁴ = etilo) en 30 ml de cloruro de metileno durante 20 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 1,5 horas, se agregó una solución mixta de 120 ml de una solución de hidrógeno carbonato de sodio acuoso al 10% y 60 ml de una

solución acuosa de hidróxido de sodio 1N para terminar la reacción. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 150 ml x 3 de cloruro de metileno. La capa orgánica combinada se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo (13, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo, R^3 , R'^3 = metilo, R^4 etilo; 30,1 g, rendimiento cuantitativo). Este compuesto se usó en el paso siguiente sin purificación.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 9,12 (q, 1H), 8,53 (m, 1H), 7,85-7,25 (m, 4H), 4,80 (m, 1H), 4,54-4,34 (m, 2H), 4,14 (q, J = 7,4 Hz, 2H), 3,99 (2d, J = 18,4 Hz, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,78 (2d, J = 8,6 Hz, 1H), 3,33 (d, 3H), 3,20 (d, 3H), 2,75 (m, 3H), 2,53 (m, 1H), 2,39 (hepteto, J = 6,7 Hz, 1H), 1,27 (t, J = 7,4 Hz, 1,5H), 1,07 (m, 6H), 0,97 (t, J = 7,4 Hz, 1,5H).

Ejemplo de preparación 6

Ácido 5-fluoro-3-[(R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-dihidro-isoxazol-5-carbonil)-amino]-4,4-dimetoxipentanoico (14, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo, R^3 , R'^3 = metilo)

Se disolvieron 30,1 g (61,6 mmoles) del compuesto obtenido del Ejemplo de preparación 5 arriba mencionado (13, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo, R^3 , R'^3 = metilo, R^4 = etilo) junto con 7,76 g (185 mmoles) de hidróxido de litio monohidrato, en un solvente mixto de 168 ml de tetrahidrofurano y 42 ml de agua, y se agitó a aprox. 40°C

40
80

durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para remover el tetrahidrofurano en el solvente, se agregaron 180 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 1N, y la mezcla se lavó con 120 ml x 2 de tolueno. La capa acuosa se acidificó con 66 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 6N, y se extrajo con 150 ml x 3 de cloruro de metileno, y la capa orgánica combinada se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto objetivo (14, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo, R^3 , R'^3 = metilo; 25,4 g, 89%). Este compuesto se usó en el paso siguiente sin purificación.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 9,10-8,92 (m, 1H), 8,52 (m, 1H), 7,86-7,13 (m, 4H), 4,77 (m, 1H), 4,54-4,34 (m, 2H), 3,95 (2d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,75 (2d, J = 18,4 Hz, 1H), 3,35-3,16 (2d, 6H), 2,78 (2dd, J = 16,0, 4,4 Hz, 1H), 2,54 (m, 1H), 2,39 (m, 1H), 2,35 (s, 1H), 1,06 (m, 6H).

Ejemplo 2

(4S,5S)-5-fluorometil-5-hidroxi-4-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-dihidro-5-isoxazolil]carbonil}-amino)-2-dihidrofuranona (1, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo).

Se disolvieron 17,0 g (36,9 mmoles) del compuesto obtenido del Ejemplo de preparación 6 arriba mencionado (14, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo, R^3 , R'^3 = metilo) y 6,6 ml (110 mmoles) de ácido acético en 123 ml (738 mmoles)

de una solución acuosa de ácido clorhídrico 6N y se agitó durante aprox. 4 horas. La temperatura interior de la mezcla de reacción se ajustó a 0°C y se agregaron 150 ml de acetato de etilo. Se agregaron lentamente 220 ml (660 mmoles) de una solución acuosa de hidróxido de sodio 3N para ajustar el pH a aprox. 3. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con 150 ml x 2 de acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con 100 ml de salmuera y se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con 50 ml de tolueno y se concentró nuevamente bajo presión reducida para dar una mezcla de los compuestos de fórmula (15) y fórmula (16) (R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo) (15,4 g, rendimiento cuantitativo, pureza química: 87,0%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 8,99 (m, 1H), 8,65 (m, 1H), 8,19-7,78 (m, 4H), 5,15 (m, 1,5H), 4,77 (m, 1H), 4,42 (m, 0,5H), 3,91 (2d, J = 17,6 Hz, 1H), 3,74 (m, 1H), 2,99 (m, 0,2H), 2,82 (m, 1H), 2,63 (m, 0,8H), 2,33 (m, 1H), 0,97 (m, 6H).

A 146 ml de tolueno se agregaron 14,6 g (35,2 mmoles) de la mezcla de los compuestos de fórmula (15) y de fórmula (16) (R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo) (pureza química: 87,0%) y la mezcla se calentó a 100°C para disolverla completamente. Luego se agregaron 14 mg de germen al compuesto objetivo (1, R^1 = 1-isoquinolinilo, R^2 = isopropilo), la temperatura se disminuyó lentamente a 20°C,

y la mezcla de reacción se agitó para producir sólido. Se agregaron 0,25 ml (1,8 mmoles) de diisopropilamina y se agitó a 20°C durante aprox. 2 semanas, para confirmar que la relación entre el compuesto de fórmula (15) y el compuesto de fórmula (16) (1, R¹ = 1-isoquinolinilo, R² = isopropilo) es de 92,8:7,2 por HPLC. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para retirar el tolueno, se agregaron 88 ml de acetato de etilo y la mezcla se calentó a 65°C para disolverla completamente. Luego se agregaron 88 ml de hexano normal y la temperatura se disminuyó lentamente y se agitó a aprox. 20°C durante 2 días. El sólido resultante se filtró y se lavó con una solución mixta de 15 ml de acetato de etilo y 15 ml de hexano normal. Después de secar el sólido con nitrógeno, se obtuvo el compuesto objetivo, un sólido blanco (1, R¹ = 1-isoquinolinilo, R² = isopropilo) con un rendimiento de 54,7% del compuesto de fórmula (2) (8,0 g, pureza química 98,6%).

Los datos NMR de sólidos de la forma cristalina se obtuvieron usando VACP MAS (rotación en ángulo mágico de polarización cruzada de amplitud variable) a una velocidad de rotación de 9 kHz.

¹H NMR (CDCl₃): 9,02 (bs, 1H), 8,54 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 7,85 (d, J = 7,95 Hz, 1H), 7,70 (m, 3H), 7,60 (bs, 1H), 4,86 (bs, 1H), 4,2-5,2 (bs, 2H), 4,05 (b, J = 19,0 Hz, 1H), 3,78 (b, J = 19,0 Hz, 1H), 2,7-3,1 (bm, 2H), 2,40 (m, 1H), 1,08

(dd, $J = 6,7, 4,9$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3): 173,8, 172,4, 160,2, 147,6, 141,7, 136,8, 130,7, 129,0, 127,4, 127,3, 126,8, 122,9, 92,3, 82,7 (d, $J = 215$ Hz), 48,9 (b), 44,6, 34,4, 33,9, 17,7, 16,3.

^{13}C NMR (sólido): 176,4, 171,8, 160,3, 150,2, 139,5, 137,5, 132,3 (2C), 127,7 (3C), 123,0, 104,3, 94,1, 86,4, 48,8, 42,9, 32,7 (2C), 19,6, 15,4.

Masa (ESI): 416,14 (M+1).

$[\alpha]_D^{25} = +3,2$ ($c = 1,0$, acetonitrilo).

Ejemplo experimental 1

Prueba de estabilidad

Como se muestra en la Fig. 2, como resultado de la prueba de estabilidad con respecto a la forma amorfa y la forma cristalina del compuesto de fórmula (1) ($R^1 = 1$ -isoquinolinilo, $R^2 =$ isopropilo), se observó que el 50% de la forma amorfa se destruyó después de 28 días bajo condiciones severas (60°C) pero la cantidad cuantitativa de la forma cristalina no disminuyó bajo las mismas condiciones (60°C) aún después de 28 días. Por lo tanto, debería entenderse que la forma cristalina tiene mejor estabilidad que la forma amorfa, suficiente para ser usada para la composición del inhibidor o el agente terapéutico.

Ejemplo experimental 2

Efecto del tratamiento sobre la hepatitis aguda inducida por LPS en ratones

~~84~~
84

Paso 1: Preparación de la muestra de sangre

Se criaron ratones Balb/c machos (6 semanas, Charles River Laboratory, Osaka, Japón) hasta 22°C bajo 55% de humedad relativa con cambio noche/día de 12 horas. Se suministraron alimentos y agua sin límite. Se disolvieron LPS (lipopolisacáridos) y D-galactosamina en las concentraciones de 0,4 mg/ml y 280 mg/ml, respectivamente, en solución salina libre de pirógenos, y se mezcló en una relación de 1:1. La solución se inyectó en ratones en la cantidad de 5 ml/kg. Inmediatamente después de la inyección de LPS y D-galactosamina, se inyectó en el animal de prueba un vehículo en donde se había disuelto el compuesto de prueba (una mezcla que consistía en PEG400 : etanol : Tween80 en 15:7,5:2,5 diluida 1/5 con solución salina) o vehículo solo. Se obtuvieron muestras de sangre de los corazones de los ratones 8 horas después de la inyección de la droga.

Paso 2: Ensayo de actividad de aminotransferasa de plasma sanguíneo

Se midió la actividad ALT de las muestras de plasma sanguíneo obtenidas en el Paso 1 usando el kit de ensayo ALT (Compañía farmacéutica Asan) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se observó que la administración de LPS y D-galactosamina aumentó rápidamente la actividad ALT en el plasma sanguíneo y el material de prueba inhibió esa

85

actividad enzimática aumentada en una manera dependiente de la dosis. En base a estos resultados, el valor DE_{50} para cada material de prueba se calculó usando software Prism (GraphPad Co.).

Ejemplo experimental 3

Efecto del tratamiento sobre la hepatitis aguda inducida por anticuerpos Fas en ratones

Se criaron ratones Balb/c machos (6 semanas, Charles River Laboratory, Osaka, Japón) hasta 22°C bajo 55% de humedad relativa con cambio noche/día de 12 horas. Se suministraron alimentos y agua sin límite. Se disolvió un anticuerpo Fas en la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ en solución salina libre de pirógenos y la solución se inyectó en los ratones en la cantidad de 5 ml/kg. Inmediatamente después de la inyección del anticuerpo Fas, el vehículo en el cual se disolvió el compuesto de prueba (una mezcla que consistía en PEG400 : etanol : Tween 80 en 15:7,5:2,5 se diluyó 1/5 con solución salina) o vehículo sólo, se inyectó en el animal de prueba. Se obtuvieron muestras de sangre de los corazones de los ratones 8 horas después de la inyección de la droga. El valor DE_{50} para la muestra de sangre obtenida se calculó usando el método de prueba arriba mencionado. La siguiente Tabla 1 muestra los resultados de la prueba del efecto farmacológico en el modelo de hepatitis aguda de acuerdo con la vía de administración del compuesto de fórmula (1)

86
86

obtenido de los Ejemplos 2 y 3 arriba mencionados.

Tabla 1

Modelo 1	Vía de administración	DE ₅₀ (mg/kg)	95% intervalo de confianza (mg/kg)
LPS/D-Gln	Administración endovenosa	0,015	0,002-0,111
	Administración oral	0,02	0,003-0,118
Anticuerpo Fas	Administración endovenosa	0,003	0,001-0,006
	Administración oral	0,018	0,013-0,026

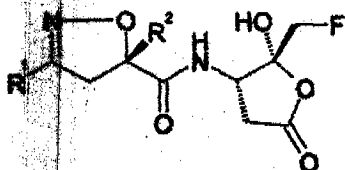
Aplicabilidad industrial

El derivado de isoxazolina que tiene hemiacetal de ácido carboxílico cíclico de fórmula (1) de acuerdo con la presente invención tiene una actividad inhibidora de la caspasa excelente y estabilidad excelente. Además, el procedimiento de acuerdo con la presente invención produce sólo un diastereoisómero de alta pureza usando transformación dinámica inducida por cristalización. Además, si el derivado amina que tiene cetel de acuerdo con la presente invención se usa como intermediario, un experto en el arte puede preparar fácilmente el derivado de isoxazolina que tiene hemiacetal de ácido carboxílico cíclico sin purificación adicional.

~~88~~
81

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (1):



(1)

caracterizado porque:

R¹ es alquilo o arilo, y

R² es alquilo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1,

caracterizado porque:

R¹ es isoquinolinilo, quinolinilo o naftilo, y

R² es metilo, etilo, propilo o butilo.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2,

caracterizado porque:

R¹ es isoquinolinilo y R² es isopropilo.

4. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (1), caracterizado porque comprende:

(a) activar un compuesto de fórmula (2), luego hacerlo reaccionar con un compuesto de fórmula (4) para producir un compuesto de fórmula (13);

(b) hidrolizar el compuesto de fórmula (13) para producir un compuesto de fórmula (14);

(c) desproteger el compuesto de fórmula (14), y

en donde:

R^1 es alquilo o arilo,

R^2 es alquilo,

R^3 y R'^3 son cada uno alquilo, o

R^3 y R'^3 junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

R^4 es alquilo.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque:

R^1 es isoquinolinilo, quinolinilo o naftilo,

R^2 es metilo, etilo, propilo o butilo,

R^3 y R'^3 son cada uno metilo, etilo o propilo, o

R^3 y R'^3 junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un dioxolano o dioxano, y

R^4 es metilo, etilo, propilo o butilo.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque el compuesto de fórmula (2) en el paso (a) es activado por un reactivo de activación seleccionado entre el grupo que consiste en cloruro de oxalilo, cloruro de trimetilacetilo, tri-cloruro de fosforilo y cloruro de tionilo.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la reacción en el paso (a) es llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, tri(n-butil)amina,

91
90

diisopropiletilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina y 4-(4-metil-piperidina-1-il)-piridina.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la hidrólisis en el paso (b) es llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre el grupo que consiste en hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de calcio.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la reacción de desprotección en el paso (c) es llevada a cabo en presencia de un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido trifluoroacético.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la reacción de desprotección en el paso (c) es llevada a cabo en presencia o ausencia de un solvente seleccionado entre diclorometano o cloroformo.

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, caracterizado porque la reacción de transformación dinámica inducida por cristalización en el paso (d) es llevada a cabo agregando el compuesto de fórmula (1) como un germen.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque la reacción de transformación dinámica inducida por cristalización en el paso (d) es llevada a cabo en presencia de un germen y una cantidad

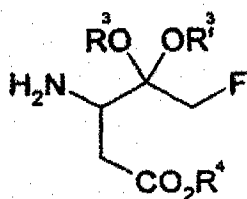
92
91

catalítica de base.

13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la base es una amina seleccionada entre el grupo que consiste en trietilamina, tri(n-butil)amina, diisopropiletilamina, diisopropilamina, piridina, 4-dimetilaminopiridina, 4-(4-metil-piperidina-1-il)-piridina, 1-feniletilamina ópticamente activa y 1-naftiletilamina ópticamente activa.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la amina se usa en una cantidad de 0,001 a 1,0 equivalente al compuesto de fórmula (14).

15. Un compuesto de fórmula (4):



(4)

caracterizado porque:

R³ y R'³ son cada uno alquilo, o

R³ y R'³ junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un heterociclo, y

R⁴ es alquilo.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque:

R³ y R'³ son cada uno metilo, etilo o propilo, o

~~93~~
92

R^3 y R'^3 junto con el átomo de oxígeno al cual están unidos forman un dioxolano o dioxano, y R^4 es metilo, etilo, propilo o butilo.

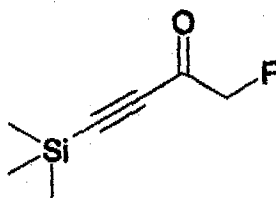
17. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (4), caracterizado porque comprende:

(a) proteger y desproteger a un compuesto de fórmula 9 para producir un compuesto de fórmula (10);

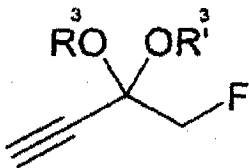
(b) llevar a cabo una reacción de acoplamiento carbono-carbono del compuesto de fórmula (10) para producir un compuesto de fórmula (11);

(c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (11) con bencilamina, y reducirlo para producir un compuesto de fórmula (12); y

(d) hidrogenar el compuesto de fórmula (12);



(9)



(10)

98
94

forman un dioxolano o dioxano, y R^4 es metilo, etilo, propilo o butilo.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado porque la reacción de protección en el paso (a) es llevada a cabo usando trimetilortoformato o trietilortoformato.

20. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado porque la reacción de desprotección en el paso (a) es llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio e hidrógeno carbonato de sodio.

21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado porque la reacción en el paso (b) es llevada a cabo usando etilcloroformato o metilcloroformato.

22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizado porque la reacción en el paso (b) es llevada a cabo en presencia de una base seleccionada entre *n*-butillitio, diisopropilamina de litio o hexametildisilazida de litio.

23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado porque la reacción de reducción en el paso (c) es llevada a cabo usando ácido acético y borohidruro de sodio.

24. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado porque la reacción en el paso (d) es

llevada a cabo en presencia de un catalizador metálico.

25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque el catalizador metálico es un catalizador de la familia del paladio o un catalizador de la familia del níquel de Raney.

26. Una composición farmacéutica para tratar la inflamación o evitar la apoptosis, caracterizada porque comprende el compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1 y vehículos farmacéuticamente aceptables.

27. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizada porque la composición se usa para demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo de transplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.

28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el compuesto es una forma cristalina que muestra el siguiente modelo de difracción de rayos X:

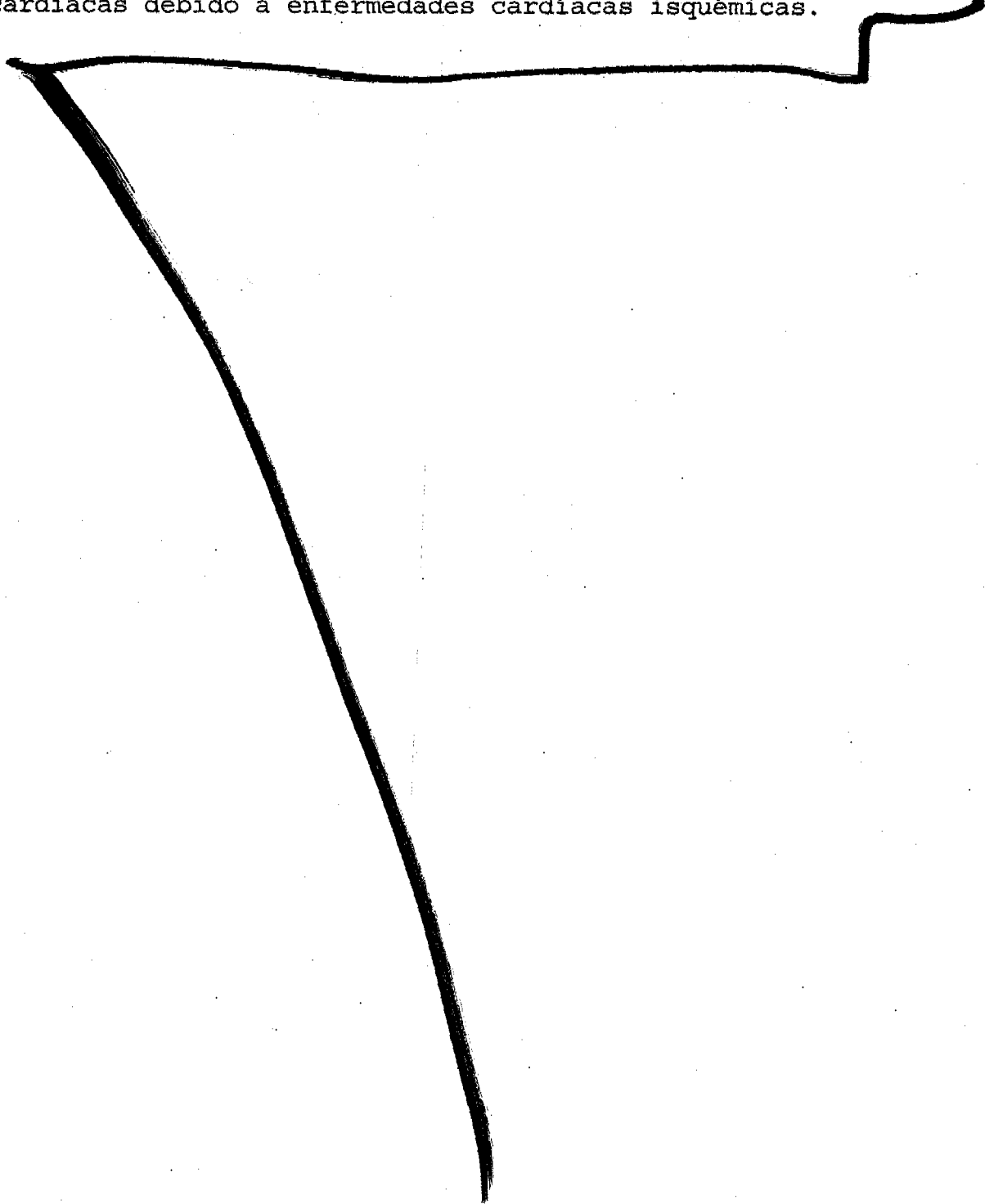
D (I)	Concentración relativa (I/I ₀)	Ángulo 2θ
9,655	0,555	9,15
7,284	0,397	12,15
5,825	0,260	15,21
5,563	0,228	15,93
5,372	0,302	16,5
4,840	1,000	18,33
4,695	0,477	18,9
4,341	0,454	20,46
3,663	0,230	24,3
3,414	0,219	26,1

29. Un método para tratar la inflamación o evitar la apoptosis en un paciente, caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1 al paciente.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, caracterizado porque el método se usa para demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo de trasplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.

31. Un uso del compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación o evitar la apoptosis.

32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, caracterizado porque el medicamento se usa para demencia, accidente cerebrovascular, daño cerebral debido a SIDA, diabetes, úlcera gástrica, lesión cerebral por el virus de la hepatitis, enfermedades hepáticas por el virus de la hepatitis, hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante, hepatocirrosis, sepsis, rechazo de transplante de órganos, artritis reumatoide, o necrosis de las células cardíacas debido a enfermedades cardíacas isquémicas.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC06001-LG	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/KR2006/000576	International filing date (day/month/year) 21 FEBRUARY 2006 (21.02.2006)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26 FEBRUARY 2005 (26.02.2005)	
Applicant LG LIFE SCIENCES LTD. et al			

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 4 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. ☐ 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(b), 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. _____

- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2006/000576

101
100

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29, 30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 29 and 30 pertain to methods for the treatment of the human body by therapy thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2006/000576102
101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 413/12(2006.01)i

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)

IPC 8 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
KOREAN PATENTS AND APPLICATIONS FOR INVENTIONS SINCE 1975Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS(ONLINE), MEDLINE, DELPHION

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/21600 A1 (LG CHEM CAL LTD.) 29 MAR 2001 See the whole document	1-14, 26-28, 31, 32
A	KR 1999-79267 A (LG CHEMICAL LTD.) 05 NOV 1999 See the whole document	1-14, 26-28, 31, 32
A	Lewis Acid Coordinated Nitrile Oxide and Nitrile Imine 1,3-Dipoles. syn- Selective Cycloadditions to 2-(1-Hydroxyalkyl)acrylates, Bull. Chem. Soc. Jpn., Vol. 66, pp 2685-2693 (1993) See the whole document	1-14, 26-28, 31, 32
A	Synthesis of a Peptidyl Difluoro Ketone Bearing the Aspartic Acid Side Chain: An Inhibitor of Interleukin-1beta Converging Enzyme, J. Org. Chem., Vol. 57, pp 7309-7314 (1992) See the whole document	15-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* 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 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

26 MAY 2006 (26.05.2006)

Date of mailing of the international search report

26 MAY 2006 (26.05.2006)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

BAIK, Kyong UP

Telephone No. 82-42-481-5412



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC06001-LG	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/KR2006/000576	International filing date(day/month/year) 21 FEBRUARY 2006 (21.02.2006)	Priority date (day/month/year) 26 FEBRUARY 2005 (26.02.2005)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D 413/12(2006.01)i			
Applicant LG LIFE SCIENCES LTD. et al			

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
 - a. ☐ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of _____ sheets, as follows:
 - ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
 - ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
 - b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:
 - ☒ Box No. I Basis of the report
 - ☐ Box No. II Priority
 - ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - ☐ Box No. VI Certain documents cited
 - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
 - ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 SEPTEMBER 2006 (21.09.2006)	Date of completion of this report 28 MAY 2007 (28.05.2007)
Name and mailing address of the IPEA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer SIHN, YOUNG SIHN  Telephone No. 82-42-481-8162

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/KR2006/000576

105
104

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☒ 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 (under Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a)).
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a)).

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

- ☒ the international application as originally filed/furnished
- ☐ the description:
- pages _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☐ the claims:
- pages _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☐ the drawings:
- pages _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☐ the sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify): _____

5. ☐ This report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2(e)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/KR2006/000576

105

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 29, 30

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 29,30

relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claims 29,30 does not require an international preliminary examination with respect to industrial applicability as it is directed to a method of treatment by therapy (Article 34(4)(a)(i), Rule 67.1(iv))

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/KR2006/000576

~~107~~
106**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-28,31,32	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-28,31,32	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28,31,32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The following documents are referred to in this report. Their numbering will be adhered to for the rest of the procedure.

D1: WO 01/21600 A1

D2: KR 1999-79267 A

D3: Bull. Chem. Soc. Jpn., Vol. 66, pp2685-2693, 1993

D4: J. Org. Chem., Vol. 57, pp7309-7314, 1992

The present invention relates to an isoxazoline derivative having the cyclic carboxylic acid hemiketal moiety of formula (1) for use as caspase inhibitor, a process for preparing it, stereochemically isomeric forms thereof, and a pharmaceutical composition comprising the same. The derivative according to the present invention can be effectively used in treating diseases due to caspases, such as, for example the disease in which cells are abnormally died, dementia, cerebral stroke, diabetes, gastric ulcer, cerebral injury by hepatitis virus, hepatic diseases by hepatitis virus, acute hepatitis, fulminant, hepatic failure, hepatocirrhosis, sepsis, organ transplantation rejection, rheumatoid arthritis, or cardiac cell necrosis due to ischemic cardiac diseases.

D1 relates to an isoxazole derivative of formula I, their pharmaceutically acceptable salts, esters and the use of the derivatives in inhibiting the activity of caspases.

D2 discloses new hetero compounds inhibiting the activity of caspases.

D3 describes Lewis acid coordinated nitrile oxide and nitrile amine 1,3-dipoles by syn-selective cycloadditions to 2-(1-hydroxyalkyl)acrylates.

D4 relates to the synthesis of the peptidyl difluoro ketone as an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme.

Continued on the next supplemental box.

108
107

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

the Box No. V.

I. Novelty (N)

The subject matter of claims 1-28, 31 and 32 is novel over the prior art documents cited in the above, and meets the criteria set out in PCT Article 33(2). The cyclic carboxylic acid hemiketal moiety of formula (1) for use as caspase inhibitor, a process for preparing it, and a pharmaceutical composition comprising the same, recited in the present claims 1-28, 31 and 32, have not been described in the prior art documents.

II. Inventive Step (IS)

Document D1 is considered to represent the most relevant state of the art before the priority date of the present application.

The present inventions of independent claims 1,4,15,17,26,31 are regarded as being inventive over D1 under PCT Article 33(3) because D1 does not disclose isoxazole derivative having tetrahydrofuran substituent (claim 1) and its preparation method (claim 4), a compound of formula (4) (claim 15), its preparation method (claim 17), and its pharmaceutical composition and use (claims 26, 27,31,32).

Claims 2,3, claims 5-14, claim 16, claims 18-25,27,28,32 are dependent claims of claims 1,3,4,15 and claims 17,26,31, respectively, and specify the substituents, base, acid, solvent, seed, and amount of base etc. Therefore, the dependent claims of claims 2,3, claims 5-14, claim 16, claims 18-25,27,28,32 are also regarded as being inventive over D1 under PCT Article 33(3).

III. Industrial Applicability (IA)

Claims 1-28, 31 and 32 meet the criteria set out in PCT Article 33(4).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 64,950
FECHA : AGOSTO 13 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-087160-00000-0000

Fecha: 2007-08-24 17:25:49 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 110

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769917	13/08/2007	39,640,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE I.
			TOTAL \$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cob 13548-841 004-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-087160- -00000-0000

Fecha: 2007-08-24 17:25:49

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONAL

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 110



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Nava C.

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

~~112~~
110

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
LG LIFE SCIENCES LTD.

REFERENCIA	Radicación No.	7 87160
	Solicitud internacional	PCT/KR2006/000576
	Fecha inicio fase nacional	26/09/07
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	12558

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

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

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

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

ALIX CARMENZA CERRERES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 05 OCT. 2007
jfernand